



TITLE:

イネ新規感光性遺伝子Se14の機能  
解析と育種への応用について(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

横尾, 敬行

---

CITATION:

横尾, 敬行. イネ新規感光性遺伝子Se14の機能解析と育種への応用につ  
いて. 京都大学, 2014, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2014-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18524>

RIGHT:

許諾条件により本文は2015-06-01に公開

イネ新規感光性遺伝子 *Se14* の  
機能解析と育種への応用について

2014  
横尾敬行









イネ新規感光性遺伝子 *Se14* の  
機能解析と育種への応用について

2014  
横尾敬行



## 目次

第 1 章	序説	1
第 2 章	光応答性に基づく開花期突然変異系統の分類（クラスター分析）	5
2.1	材料および方法	7
2.2	結果	13
2.3	考察	20
第 3 章	HS112 の原因遺伝子 <i>Se14</i> の単離と機能解析	26
3.1	材料および方法	27
3.2	結果	35
3.3	考察	44
第 4 章	<i>Se14</i> の収量構成要素への影響の検証	50
4.1	材料および方法	51
4.2	結果	52
4.3	考察	59
第 5 章	総括	62
第 6 章	摘要	66
	引用文献	69



## 第 1 章

### 序説

高等植物が栄養生長期から生殖生長期に移行し花芽を分化することを花成と言う。植物は外的環境の情報をもとに適切な時期に花成を開始する能力を長い進化の過程で獲得してきた。温度と日長時間は植物の花成開始時期を決定する外的要素であり、特に日長時間は多くの植物において花成を制御する主要因となっている。植物には、一定の日長時間（限界日長）より長い日長条件（長日条件）下で花成が促進される長日植物と限界日長より短い日長条件（短日条件）下で花成が促進される短日植物がある。植物の花成制御機構の解明は、長日植物のモデル生物であるシロイヌナズナの花成研究を中心に行われてきた。

シロイヌナズナの花成は、4 つの異なる経路によって支配され極めて複雑な制御機構を形成していることがわかっている。4 つの経路のうち、光周性依存的経路は *GIGANTIA (GI)*-*CONSTANS (CO)*-*FLOWERING LOCUS T (FT)* という遺伝子によって構成され、日長時間と概日時計の制御を受けて花成を誘導していることがわかっている。概日時計によって発現を制御されている花成関連遺伝子 *GI* は日中にピークを刻む遺伝子発現リズムを持つ。その下流に位置する *CO* も同様に日中から夕方にかけて高発現する概日リズムを刻んでいる。*CO* は光依存的に安定性が制御されており、長日条件では夕方の光入力によって高度に蓄積した *CO* が *FT* の発現を誘導する。*FT* は花成ホルモンの正体とされ、*FT* の発現が誘導されるとシロイヌナズナは花成が開始される（Corbesier *et al.* 2007）。花成誘導経路 *GI-CO-FT* は植物に普遍的に存在しており、イネにおいては *GIGANTIA (GI)*-*Heading date (Hd1)*-*Heading data 3a (Hd3a)*がその役



割を担っている (Yano *et al.* 2000, Tamaki *et al.* 2007, Izawa *et al.* 2011)。イネには *FT* のホモログが 2 つ存在し、*Hd3a* と *RICE FLOWERING LOCUS T1 (RFT1)* が短日条件下での開花誘導と長日条件下での開花誘導をそれぞれ分担している (Komiya *et al.* 2008, 2009)。一方で、イネ特異的な花成誘導因子として *Early heading date 1 (Ehd1)* が *Hd1* とは独立的に *Hd3a* や *RFT1* の発現を誘導している (Doi *et al.* 2004)。*Ehd1* は B タイプのレスポンスレギュレーターをコードする遺伝子で、イネ以外でパラログが見つかっていない。*Ehd1* は多くの開花関連遺伝子によって発現が制御されており、*Ehd1* を中心とするイネ特異的な花成制御経路を形成している。このように、イネにおいては植物に高度に保存された経路とイネに特異的な経路が独立的に花成を制御している。

短日植物であるイネは短日条件下では早期に開花が開始されるが、長日条件下では花成誘導が抑制されて開花が遅延する。この長日条件に応答して花成が遅延する性質のことは特に「感光性」と呼ばれる。感光性はイネの開花特性を左右する主要な形質であるため、イネの花成研究においても特に多くの関心が払われてきた。イネの感光性を制御する遺伝子 (感光性遺伝子) として最初期に単離された遺伝子が *Se5* と *Hd1* である (Izawa *et al.* 2000, Yano *et al.* 2000)。*Se5* はフィロクロム発色団合成酵素をコードする遺伝子であり、イネに 3 種類あるフィトクロム (PHY-A, B, C) の活性に不可欠な遺伝子である。そのため、イネが日長時間を認識し感光性を発揮するためにはフィトクロム由来の赤色光シグナルが必要であることがわかった。*Hd1* は短日条件下ではシロイヌナズナの *CO* と同様に *Hd3a* の発現を誘導するが、長日条件では逆に *Hd3a* の発現を抑制することで感光性に貢献している。さらにその後、新たなイネ感光性遺伝子として *Grain number, plant height, and heading date7 (Ghd7)* が単離された (Xue *et al.* 2008)。

*Ghd7* はシロイヌナズナなどの双子葉植物にはオルソログの存在しない遺伝子で、CCT (CO, CO-LIKE, and TIMING OF CAB1)ドメインを持つタンパク質をコードする。*Ghd7* は長日条件においてのみ発現し、*Ehd1* の発現を抑制している。以上のように、イネの感光性は 2 つのイネの花成制御経路上で *Hdl* と *Ghd7* が長日条件下において花成を抑制することで成り立っていると考えられている。しかし、シロイヌナズナでわかっている花成制御機構に比べイネの花成制御研究はまだ知見が乏しいこと、現在の知見だけではイネの感光性制御の全てを説明できないことから、未知の感光性制御経路の存在が示唆されている。感光性の僅かな違いによってイネの地域適応性にも影響を与えうることから、未知の感光性経路の解明は今後のイネ育種学の重要な研究課題である。

シロイヌナズナにおける研究では、突然変異体を利用した順遺伝学解析が実験手法として確立されており、花成研究でも多くの花成制御関連遺伝子が突然変異体から単離されてきた。イネ研究でも、近年 T-DNA 挿入ラインの整備などによって遺伝資源を充実させて研究に活かす取り組みが進められている。本研究室では、イネにガンマ線を照射して突然変異を誘発した個体から多数の開花期突然変異系統を作出しており、それらの系統の解析によって新規花成関連遺伝子を単離してきた (Yuan *et al.* 2009, Saito *et al.* 2011)。しかし、研究の進展するにつれ現在の手法は新たな課題に直面している。ひとつは、多くの花成制御遺伝子座が同定された結果、花成制御に関わる新規遺伝子座の同定が難しくなっていることである。当研究室における先行研究でも、突然変異系統の原因遺伝子の探索によって既知遺伝子座の突然変異型の対立遺伝子が単離された例がある (井上 2008, Xu 2014)。そのため、未知の花成関連遺伝子座上に新規遺伝子を持つ突然変異系統を簡便かつ高精度に予測する手法を確立する必要がある。また、別の

課題として、現状の突然変異系統の選抜法では類似した機能性を持つ遺伝子ばかりが単離されてしまうという点がある。シロイヌナズナの花成はタンパク質間相互作用・ホルモン伝達またはクロマチン修飾などの多様な分子間相互作用によって制御されていることがわかっている。イネの花成においても多用な機能を持った遺伝子が関与していることが予想されるが、現在のイネの花成研究ではほとんど同定することができていない。よって、イネの花成研究の今後の課題として、既知遺伝子とは異なる機構によって花成を制御する遺伝子を同定する手法の確立がある。

そこで、本研究では従来の開花特性評価法とは異なる新しい光応答性試験によって、未知の感光性メカニズムの探索と新規の機能を持つ花成関連遺伝子の同定を目指した。まず、第2章において、異なる光環境条件下における突然変異系統の出穂調査によって、突然変異系統を開花期形質によって分類した。その結果、開花期突然変異系統には特徴的な形質を持つ系統が含まれていたことがわかった。そして、既知花成関連遺伝子の突然変異系統とは明らかに異なる光応答性を示す系統 HS112 を見出した。第3章では、HS112 の原因遺伝子である *Se14* を単離するとともに、発現解析や ChIP アッセイによって *Se14* が花成誘導経路上で果たす役割について検証した。その結果、*Se14* はヒストン修飾によって *Hdl* や *Ghd7* と独立に感光性を制御していることがわかった。さらに、第4章では、HS112 の収量構成要素を調査し HS112 において分げつ数などのいくつかの農業形質が変異していることを明らかにするとともに、その原因が HS112 のブラシノステロイドに対する強感受性による可能性を示した。

## 第 2 章

### 光応答性に基づく開花期突然変異系統の分類（クラスター分析）

イネの花成の研究を行う上で、突然変異系統を利用した順遺伝学的解析が有効である。当研究室は品種銀坊主に突然変異誘発刺激を与えることで得られた開花期突然変異系統の解析によって、これまでに基本栄養成長性を制御する遺伝子（基本栄養成長性遺伝子）として *Ef7*、感光性遺伝子として *Se13* を単離してきた（Yuan *et al.* 2009, Saito *et al.* 2011）。また、近年は銀坊主において転移活性を持つトランスポゾン *mPing* をマーカーとして利用する *mPing* sequence characterized amplified region (*mPing* SCAR marker) を活用した遺伝子マッピングによって迅速な遺伝子単離が可能となったため、今後も更なる花成関連遺伝子の単離が期待できる（Monden *et al.* 2009, Xu 2014）。その一方で、昨今のイネの花成研究の進展に従って順遺伝学的手法は新たな問題に直面している。それは、多くの花成関連遺伝子が単離された結果、新規花成関連遺伝子座が見つかりにくくなっていることである。先行研究において主要な感光性遺伝子座 *Hdl* の機能欠損型の対立遺伝子が複数単離されてきたことから（Xu 2014）、既知の花成関連遺伝子の突然変異体が選抜されやすいことが示唆されている。現在、イネの感光性は短日条件（10 時間程度の日長時間）下での到穂日数を基本栄養成長性、長日条件（14 時間程度の日長時間）下での到穂日数と短日条件下の到穂日数との差を感光性として評価する方法が主流となっているが（細井 1979, 1981）、この評価法では未知の花成関連遺伝子の突然変異系統の開花期形質を見落としている可能性がある。そこで、日長時間とは異なる環境要因で開花期突然変異系

統の開花期特性を再評価することで特色のある開花期形質を持つ系統を見つける方法を確立する必要がある。

近年の研究によって、イネの感光性は植物の赤色光受容体フィトクロム由来のシグナル伝達と青色光受容体クリプトクロムおよびフォトトロピン由来のシグナル伝達が花成制御に関与することで生じることが明らかにされた。イネにおいて、感光性遺伝子である *Hd1* は長日条件下で *Hd3a* の発現を抑制することで開花を遅延させる (Yano *et al.* 2000)。しかし、長日条件下における *Hd1* の *Hd3a* 発現抑制効果はフィトクロム由来の赤色光シグナルに依存的であり、*phyB* 背景下では *Hd1* の *Hd3a* 発現制御機能は発揮されない (Yokoi *et al.* 2005, Ishikawa *et al.* 2011)。

また、*Ghd7* も同様に赤色光依存的に *Ehd1* の発現抑制効果を持つとともに、*Ghd7* 遺伝子発現も赤色光によって誘導されている (Osugi *et al.* 2011)。さらに、*Ghd7* の発現の赤色光応答性は時間的に変化しており、短日条件下では夜中に、長日条件下では明け方に応答性のピークを迎えることも明らかとなっている (Itoh *et al.* 2010)。この日長による応答性の違いによって、*Ghd7* は長日条件下にのみ発現が誘導されている。このような時間的に変化する光応答性は *Ehd1* の発現制御にも存在しており、*Ehd1* は日長によらず明け方にピークを持つ青色光応答性を持っている (Itoh *et al.* 2010)。以上のように、イネの感光性の分子の実体は赤色光依存的な *Hd1* と *Ghd7* の花成抑制機能や青色光応答性の *Ehd1* の発現制御だと考えられている。そこで、日長変化への応答性ではなく赤色光応答性と青色光応答性として開花期突然変異系統の開花期形質を調査することで、イネの感光性を別の側面から評価することができると考えられる。

また、イネの開花期は日長以外に温度による影響を強く受けているが、日本品種は感光性に比べて温度応答性がイネの花成制御に果たす役割は小さいと考えられている (細井 1981)。そ

のため、分子的解析は殆ど行われておらず、突然変異系統の温度応答性が大規模に調査された  
先行研究も存在しない。そこで、開花期突然変異系統の温度応答性を調査することで、温度応  
答性の違いによって開花期形質を再評価できると考えられる。

以上のように、赤色光応答性・青色光応答性および温度を利用することで日長の変化によら  
ない開花期形質の評価が可能であると考えられる。本章は、外気温条件と光環境条件が異なる  
8つの環境条件下で開花期突然変異系統の到穂日数を調査し、開花期突然変異系統の開花期形  
質を再評価した。さらに、開花期突然変異系統を開花期形質によって分類することで、既知開  
花期関連遺伝子の突然変異系統とは異なる形質を持つ開花期突然変異系統を探索した。

## 2.1 材料および方法

### 共試材料

イネ品種日本晴と品種銀坊主ならびに *E1* 座 (*Ghd7* 座) 以外は遺伝的背景が銀坊主とほぼ等  
しい HEG2 に加えて、銀坊主のガンマ線照射後代より得られた開花期突然変異系統 (HS 系統、  
X 系統、IM 系統、MG 系統、KG 系統) 61 系統を供試した。その多くは、原因遺伝子が未同定  
であるが、一部の系統に関しては原因遺伝子が同定されている (井上 2008; 表 2-1)。銀坊主  
自殖後代より得られた開花期関連遺伝子突然変異系統 (GP 系統) 2 系統、既知開花期関連遺伝  
子変異系統を交配して作出した多重変異系統 (DMG 系統、TMG 系統) 15 系統を供試した。

### 光環境応答性試験

京都大学大学院農学研究科附属京都農場に設置された日長処理室を用いて自然光と人工光に

表2-1 供試系統の8光環境条件条件下における到穂日数

SLNと454は品種日本晴と銀坊主の野生型。DMGおよびTMGは銀坊主遺伝子型背景下で既知開花期関連遺伝子の2重変異系統と3重変異系統。X系統・HS系統・MG系統およびKG系統は銀坊主にガンマ線を照射して得られた開花期突然変異系統。GP系統は銀坊主遺伝子型背景下で開花期関連遺伝子座にトランスポゾン*mPing*が挿入した系統。HEG2は*Ghd7*座（*E1*座）に関する検定系統。

		遺伝子型	2011SD	2011LD	2011BL	2011RL	2012SD	2012LD	2012BL	2012RL
日本晴	SLN	野生型	41.40	73.60	43.40	105.60	52.20	82.40	86.70	101.00
銀坊主	454	野生型	46.60	67.53	44.85	93.30	58.50	79.85	78.25	100.60
X系統	11	*	45.20	80.60	51.27	104.38	68.17	85.25	85.90	104.00
	18		49.70	93.53	54.08	121.20	55.23	76.47	76.50	102.65
	31		53.33	75.05	58.67	124.05	54.80	74.67	76.60	110.82
	34		47.80	81.55	54.25	145.00	55.78	89.23	86.45	125.60
	36		53.40	74.90	55.28	102.80	65.35	81.50	86.50	107.70
	51		45.00	62.50	43.60	95.90	54.17	87.00	71.67	104.80
	61		40.50	48.50	40.50	N.D.**	61.45	65.90	65.00	71.20
	66		48.25	69.40	48.05	76.08	50.90	77.10	74.40	85.50
	69		43.40	103.90	45.70	117.50	58.50	102.80	107.42	110.78
	72		41.40	94.88	45.50	127.00	52.60	98.00	98.70	112.30
	73	<i>sel3</i>	43.95	67.90	48.40	117.63	54.63	79.00	81.30	103.10
	76		52.17	77.22	52.60	111.10	62.20	83.43	84.70	101.50
	78		46.50	69.40	47.40	111.25	53.40	80.03	80.20	98.90
	81		48.20	80.65	46.68	149.25	56.80	92.90	97.75	109.10
	120		43.40	65.30	43.70	100.20	48.80	76.40	77.35	91.05
	124		47.90	64.60	44.80	99.40	54.10	76.70	79.60	93.50
	128		47.20	72.10	45.20	123.70	57.70	75.60	75.15	94.70
	137		46.80	90.30	46.60	N.D.	53.00	79.40	80.97	95.50
	150		57.63	59.20	56.25	65.03	68.00	68.88	69.50	80.33
	151		56.75	65.33	54.00	N.D.	65.33	67.20	70.72	77.40
	152		56.80	58.25	59.70	70.75	69.90	68.30	72.33	79.60
	155		53.43	61.90	51.10	69.04	58.70	67.30	69.70	74.30
	160		44.10	88.80	46.40	90.10	52.40	75.80	86.30	79.50
	180		45.70	67.87	45.60	98.90	54.00	75.50	75.20	85.80

\* 空欄は原因遺伝子が未同定  
 \*\* 枯死によりデータなし

表2-1

		遺伝子型	2011SD	2011LD	2011BL	2011RL	2012SD	2012LD	2012BL	2012RL
HS系統	17		45.40	94.40	45.60	95.70	55.90	91.93	92.00	103.80
	23		49.70	68.60	47.70	119.13	59.20	80.00	78.00	124.50
	32	<i>hd1</i>	48.30	63.22	49.13	80.15	58.53	74.00	72.90	84.60
	43	<i>ghd7</i>	48.00	78.10	46.10	93.38	56.75	83.65	80.40	87.60
	45		44.60	83.50	46.13	81.67	53.70	89.33	89.40	92.30
	50		41.17	66.40	44.00	68.50	55.50	74.17	72.83	79.50
	54		44.63	86.60	47.40	88.85	54.70	92.20	90.20	103.92
	56		46.70	93.18	47.50	88.70	56.30	90.38	92.40	101.00
	63		45.70	92.50	48.30	86.15	56.00	90.00	89.00	91.60
	89		45.30	73.25	46.10	95.30	56.25	83.63	80.97	97.50
	93		45.30	75.00	47.70	95.18	53.82	84.30	82.30	98.00
	94		46.70	98.40	54.50	112.23	57.00	96.75	95.60	108.23
	105	<i>ghd7</i>	42.00	69.50	44.70	75.00	48.20	76.50	73.70	82.38
	110	<i>hd1</i>	51.30	63.90	51.70	88.40	61.40	75.50	74.33	91.38
	112	<i>se14</i>	46.55	65.38	45.68	106.21	54.90	75.70	74.00	120.67
	113	<i>se17</i>	49.30	60.90	45.70	69.70	57.50	73.80	83.60	86.38
	167	<i>hd5</i>	53.38	70.55	52.00	82.60	60.30	81.13	75.60	89.90
	169	<i>ehd1</i>	67.20	91.90	72.83	N.F.***	74.20	97.17	98.90	N.F.
	200		46.60	69.38	49.70	95.30	55.10	80.00	77.60	96.70
	235		56.10	70.80	56.20	81.10	63.70	79.90	79.38	88.70
	239		43.00	69.90	43.00	100.55	52.10	81.97	85.40	95.70
	242		43.70	106.96	48.70	132.71	57.30	103.60	104.40	112.28
	243		37.20	85.63	40.20	99.30	50.00	82.80	84.70	93.20
	247		55.18	71.10	57.00	84.04	63.40	81.00	80.13	89.60
	251	<i>hd1</i>	50.10	58.60	52.37	63.10	59.90	72.63	69.00	72.10
	254	<i>se15</i>	55.00	71.80	56.70	83.13	62.90	78.72	79.70	87.50
	257		55.88	71.50	55.90	83.32	62.70	80.00	77.80	87.00
	263	<i>hd1</i>	53.18	58.00	53.83	63.55	60.97	64.40	65.90	71.60
	276	<i>ef7</i>	56.20	90.10	58.03	N.F.	66.40	92.50	97.57	121.77
	283		45.60	85.93	50.40	95.00	55.60	85.00	85.60	91.90
	313	<i>hd1</i>	50.82	65.00	53.60	86.53	62.70	76.40	79.60	88.20

\*\*\* 未出穂によりデータなし



表2-1

		遺伝子型	2011SD	2011LD	2011BL	2011RL	2012SD	2012LD	2012BL	2012RL
IM系統	13		38.50	60.20	41.20	63.30	50.10	70.50	66.40	78.20
	18		39.20	98.60	44.95	97.40	55.40	95.60	89.90	102.50
	49		39.70	98.10	44.10	104.30	53.60	97.88	92.00	99.55
	227		40.90	104.80	46.30	95.75	56.70	101.10	95.10	116.18
MG系統	286		48.60	65.47	47.97	82.93	58.43	79.50	85.40	85.70
KG系統	17		39.95	77.13	45.15	101.95	51.40	80.30	71.70	88.00
GP系統	2	<i>hd3a</i>	54.82	68.20	54.50	107.50	61.80	79.60	79.90	99.50
	7	<i>osmads50</i>	47.30	69.20	47.43	105.03	53.80	79.85	77.50	99.80
HEG系統	2	<i>ghd7</i>	43.95	69.47	44.05	76.90	55.22	79.50	77.40	85.00
DMG系統	2	<i>ehd1 se13</i>	74.43	81.10	72.33	95.20	84.17	88.96	93.43	97.67
	3	<i>hd1 ehd1</i>	79.90	88.10	77.20	118.50	84.20	83.70	83.60	105.50
	4	<i>se13 ghd7</i>	40.50	48.50	40.50	N.D.	54.80	53.42	54.33	65.65
	5	<i>hd1 ghd7</i>	50.40	58.60	50.88	68.55	62.00	65.30	62.30	78.18
	6	<i>ehd1 ef7</i>	N.A.	104.20	82.00	N.F.	93.00	N.F.	N.F.	N.F.
	7	<i>hd1 ef7</i>	55.93	71.80	56.30	94.50	74.40	79.05	79.20	91.25
	8	<i>ef7 ghd7</i>	47.65	72.63	49.15	93.33	67.80	77.37	77.77	90.90
	9	<i>se13 ef7</i>	59.50	88.20	63.10	98.20	71.70	88.93	91.70	97.42
	10	<i>ehd1ghd7</i>	72.20	103.70	64.90	130.13	75.30	94.50	98.50	108.72
	11	<i>se14 hd1</i>	49.03	56.30	50.70	76.50	61.50	66.30	65.40	84.30
TMG系統	1	<i>hd1 ehd1 ef7</i>	81.58	94.38	80.00	121.42	91.20	92.50	90.50	111.50
	2	<i>hd1 ehd1 se13</i>	76.70	79.90	78.00	80.37	84.90	83.93	81.85	89.40
	3N	<i>hd1 ehd1 ghd7</i>	82.00	104.30	80.25	120.30	85.70	90.25	83.33	98.00
	3E	<i>hd1 ehd1 ghd7</i>	69.50	75.93	73.03	84.03	86.43	86.93	88.80	93.60
	3L	<i>hd1 ehd1 ghd7</i>	81.33	99.60	80.25	113.13	84.80	90.20	88.80	95.80

よる補光によって供試材料を栽培した。種子は30℃ 暗黒条件下で1000倍希釈のベンレート水溶液（住友化学）に24時間浸して除菌した後、同条件下で48時間浸水して催芽処理をした。粒状培土（揖斐川工業）とバーミキュライト（ニッタイ株式会社）重量比4：1混合した混合土をセルトレイ（4×8）に満たし、トレイの下部にも粒状培土を敷き詰めた。系統ごとに10粒/セルを播種し、播種後2週間目に間引いて5個体とした。各処理について5個体/反復・系統を用いて、2反復行った。2011年度は6月9日に播種後、短日条件（2011SD; 10時間明期／14時間暗期）、長日条件（2011LD; 14時間明期／10時間暗期）、青色光条件（2011BL; 12時間明期／10時間暗期／2時間青色光）、赤色光条件（2011RL; 14時間明期／10時間暗期・15分の赤色光による光中断）の4条件下で育成した（図2-1A）。また、2012年度は5月25日に播種を行い、短日条件（2012SD; 10時間明期／14時間暗期）、長日条件（2012LD; 14時間明期／10時間暗期）、青色光条件（2012BL; 10時間明期／10時間暗期／4時間青色光）、赤色光条件（2012RL; 10時間明期／14時間暗期・15分の赤色光による光中断）の4条件下で育成した（図2-1B）。京都大学大学院農学研究科附属京都農場（京都市、北緯35度01分）において午前8時から午後6時までの10時間は太陽光下で育成し、14時間の日長条件下では白熱灯による人工光(3.24 Wm<sup>-2</sup> at soil surface)を午後6時から午後10時まで照射した。青色光照射には450nm波長の陰極蛍光管を、赤色光照射には660nm波長の陰極蛍光管をそれぞれ用いた。

#### 開花期の調査

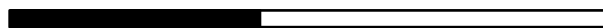
出穂日の調査は供試した全個体について出穂日を調査し、個体間の最初の穂の先端が止葉の葉鞘から抽出した日を個体の出穂日とした。系統ごとに平均到穂日数を算出し2反復の平均値

**A**

2011SD (14時間暗期/10時間明期)



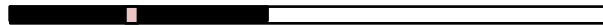
2011LD (10時間暗期/14時間明期)



2011BL (12時間暗期/ 2時間青色光 /10時間明期)



2011RL (10時間暗期中15分赤色光 /14時間明期)



**B**

2012SD (14時間暗期/10時間明期)



2012LD (10時間暗期/14時間明期)



2012BL (10時間暗期/ 4時間青色光 /10時間明期)



2012RL (14時間暗期中15分赤色光 /10時間明期)



## 図2-1 開花期形質評価実験に利用した光環境条件

A. B. 2011年度および2012年度に行った開花期形質評価実験における光環境条件。

を系統の平均到穂日数とした。また標準偏差は10個体の到穂日数を個別の値として算出した。

## 系統分類

2011 年及び 2012 年の計 8 条件下での到穂日数を基にクラスター解析により最近接法による系統分類を行った。各環境条件下での到穂日数は全系統の平均値と標準偏差で正規化した。その後、統計ソフト R (<http://www.r-project.org>) を用いて各値を Z score 化し、ヒートマップを作成するとともに最近接法による階層的クラスタリングを行った。解析をするにあたり、播種後 150 日経過しても出穂しなかった個体の到穂日数は 200 日として扱った。

## 2.2 結果

### 光環境応答性試験

2011 年度と 2012 年度で播種日を 15 日ずらしたことによって、播種後 15 日から 45 日の平均気温が 2011 年度で 1.9℃～9.4℃（平均 5.2℃）高くなった（図 2-2）。多くの系統が全環境条件下で出穂したが、播種後 150 日を経過しても出穂しなかった場合は N.F.とした（表 2-1）。

いくつかの光環境条件は到穂日数の分布に相関が認められた。2011SD と 2012SD との比較では、2 条件での到穂日数が極めて高い相関が見られたが（ $r=0.926$ ）、全ての系統が 2012SD よりも 2011SD で出穂が早まっていた（図 2-3A）。一方、2011LD と 2012LD との比較では、高い相関関係にあり（ $r=0.873$ ）、早生系統では 2011LD よりも 2012LD で出穂が早まる傾向も認められたが、晩生系統ではその傾向が弱く、むしろ出穂が遅くなった系統もあった（図 2-3B）。

2011BL と 2011SD との間、ならびに 2012BL と 2012LD との間には到穂日数に関して高い相関

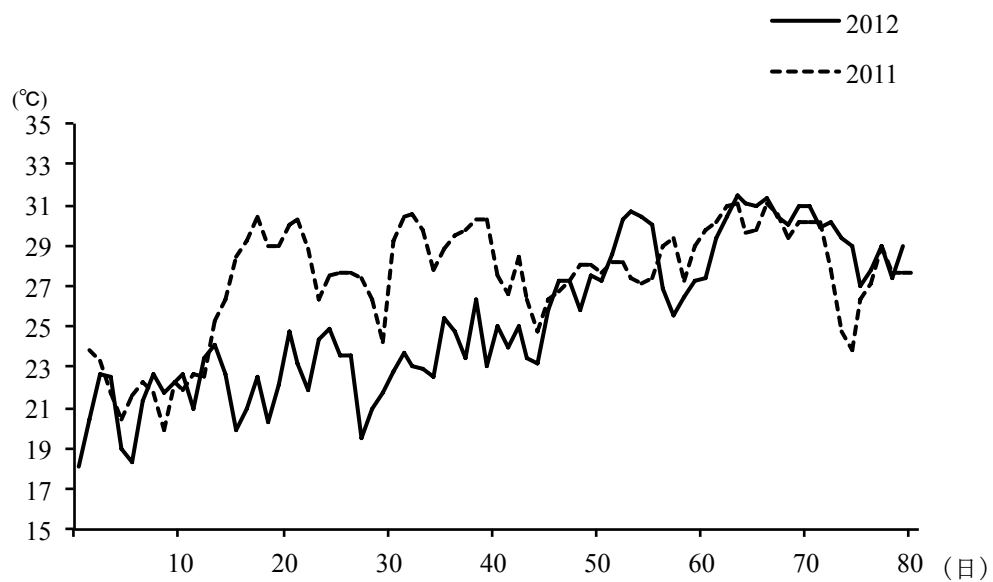
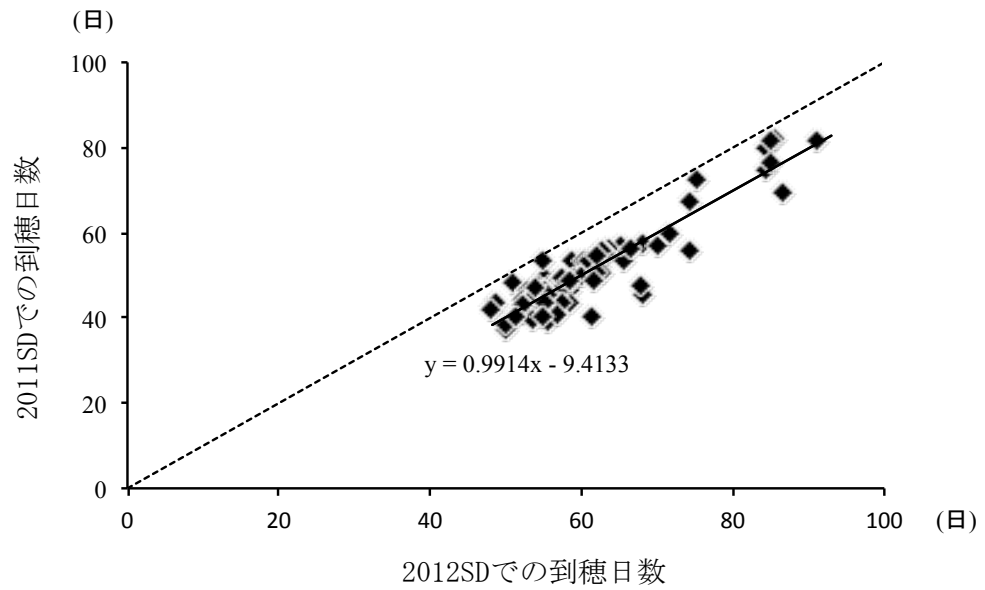


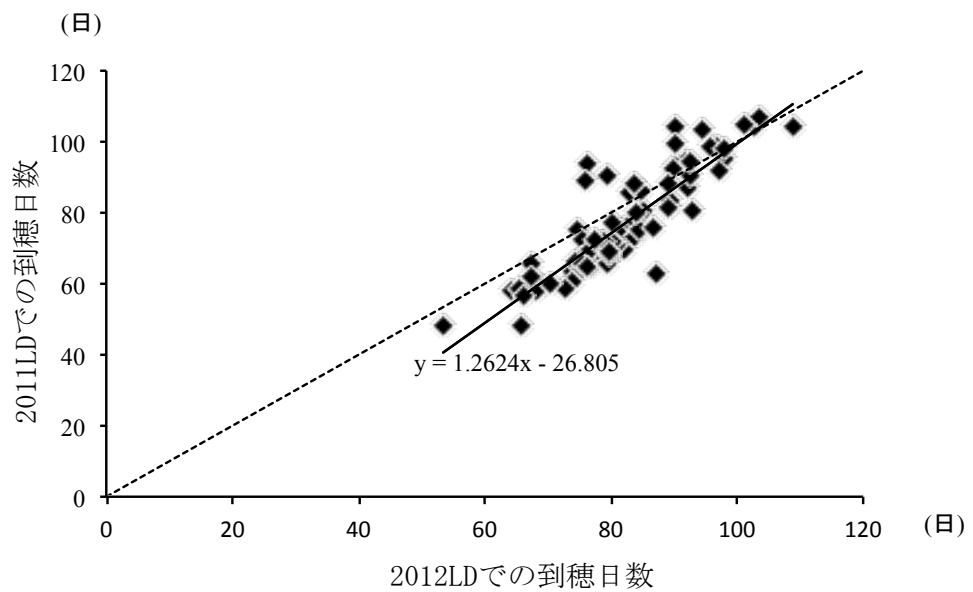
図2-2 開花期形質評価実験における温度条件

2011年度と2012年度における供試材料播種後の平均気温の推移。  
 (国土交通省; <http://www.jma.go.jp/jma/index.html>)

**A**



**B**



**図2-3 各系統の温度応答性**

- A. 2011SDと2012SDでの到穂日数の相関。  
B. 2011LDと2012LDでの到穂日数の相関。  
直線は回帰直線、点線は $Y=X$ 。

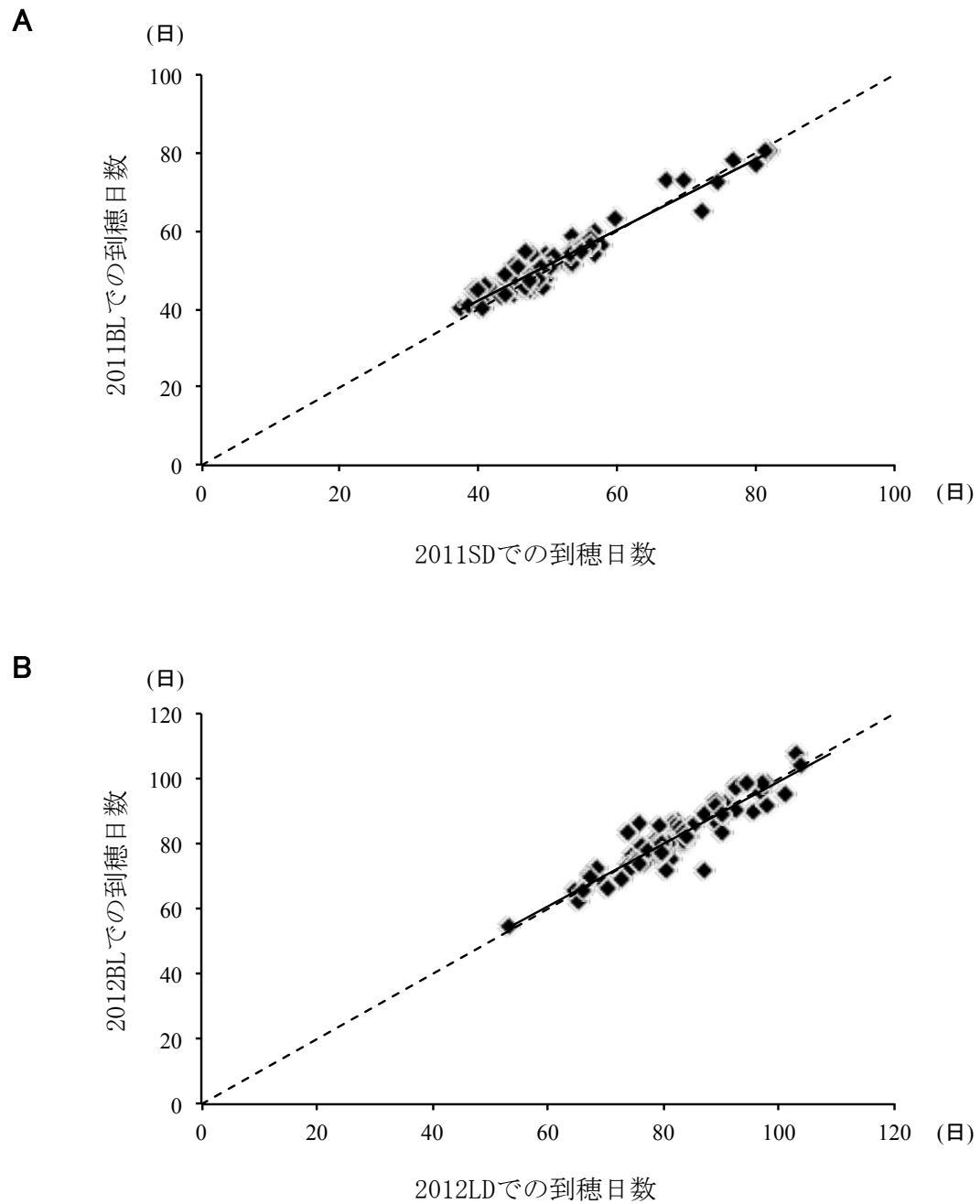


図2-4 各系統の青色光応答性

- A. 2011SDと2011BLでの到穂日数の相関。  
 B. 2012LDと2012BLでの到穂日数の相関。  
 直線は回帰直線、点線は $Y=X$ 。

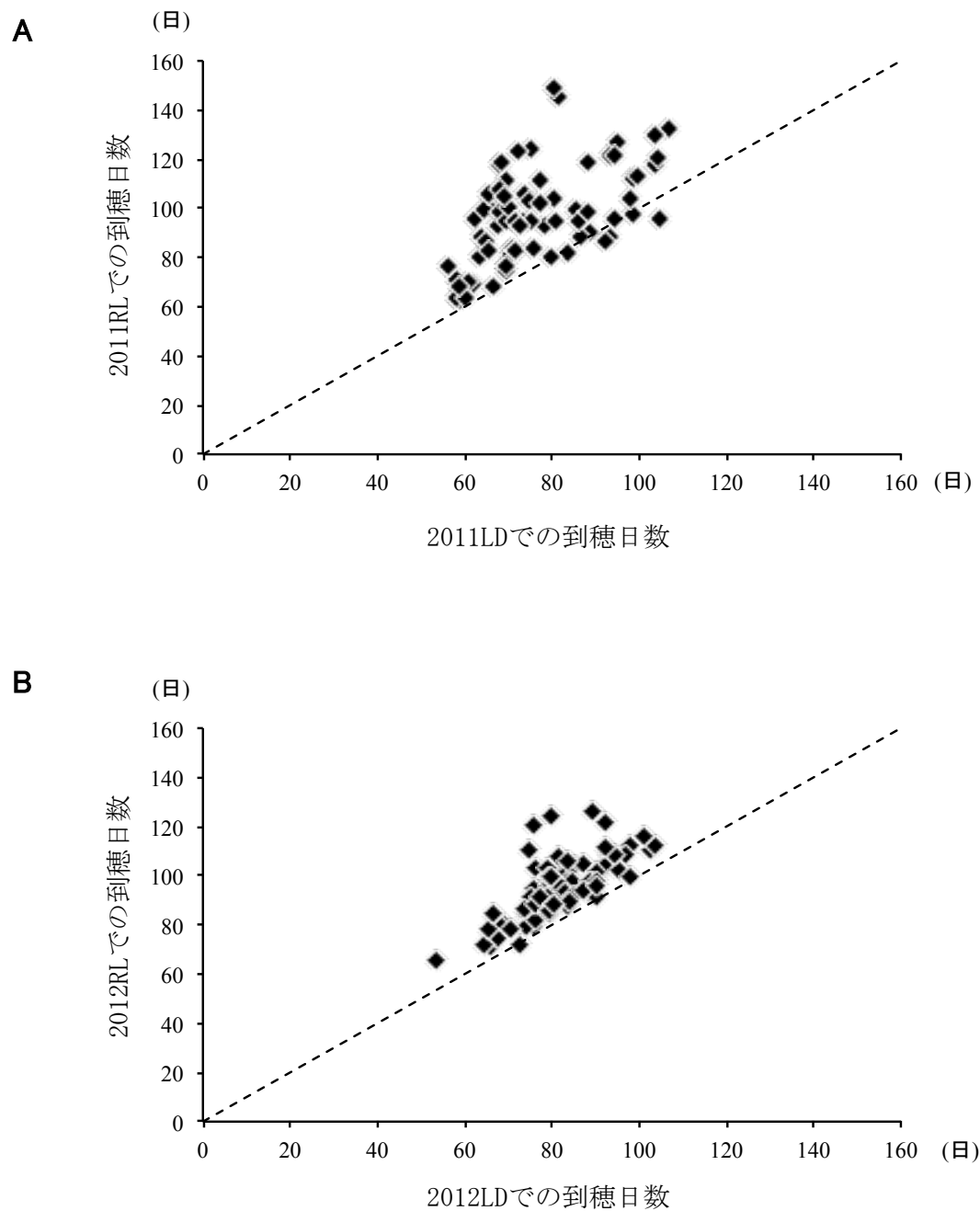


図2-5 各系統の赤色光応答性

- A. 2011LDと2011RLでの到穂日数の相関。  
 B. 2012LDと2012RLでの到穂日数の相関。  
 点線は $Y=X$ 。



関係が認められた ( $r=0.966$ ,  $r=0.926$ ; 図 2-4A, B)。2011RL および 2012RL では多くの系統が 2011LD および 2012LD よりも出穂が遅延していたが、その傾向は日長時間の長い 2011RL の方がより強くなった (図 2-5A, B)。

#### 系統分類

8 条件下での各系統の到穂日数を正規化した後、階層的クラスタリングによって系統を分類した結果、81 系統を 9 つのクラスター A~I に分けられた (図 2-6)。クラスター A およびクラスター B は全ての条件下で出穂が野生型よりも遅延した系統が含まれたが、クラスター A では 2012RL による遅延が顕著な系統が、クラスター B には長日条件での遅延が顕著な系統が分類された。クラスター C には、*Hd5* 座が非機能型対立遺伝子である HS167 (Xu 2014) や *Hd3a* 座の第 1 エキソンに *mPing* が挿入した GP2 (斎藤 未発表データ) などのいくつかの既知花成関連遺伝子の変異系統や DMG7 (*ghd7 ef7*) や DMG8 (*sel3 ef7*) といった *Ef7* 座非機能型対立遺伝子と感光性遺伝子の非機能型対立遺伝子を組み合わせた二重変異体が属する結果となった。クラスター D は二重または三重変異系統から構成されるクラスターで、DMG9 (*sel3 ef7*) 以外は欠損型対立遺伝子の *ehd1* と 3 つの感光性遺伝子 *Se13*、*Hd1*、*Ghd7* いずれかの欠損型対立遺伝子を併せ持つ系統であった。クラスター E は *Ehd1* 座の欠損型変異体である HS169 だけで構成されるクラスターで、*Ehd1* 座の効果が出穂制御において際立っていることを示した。クラスター F は、全ての *Hd1* の単一欠損変異体 (HS32、HS110、HS251、HS263、HS313) と *Ghd7* の欠損変異体 (HS105 および HEG2 (井上 2008)) の 2 系統、さらに *Hd1* とその他感光性遺伝子の二重変異体 (DMG5 (*hd1 ghd7*) および DMG11 (*hd1 sel4*)) など、非感光性系統の多くが

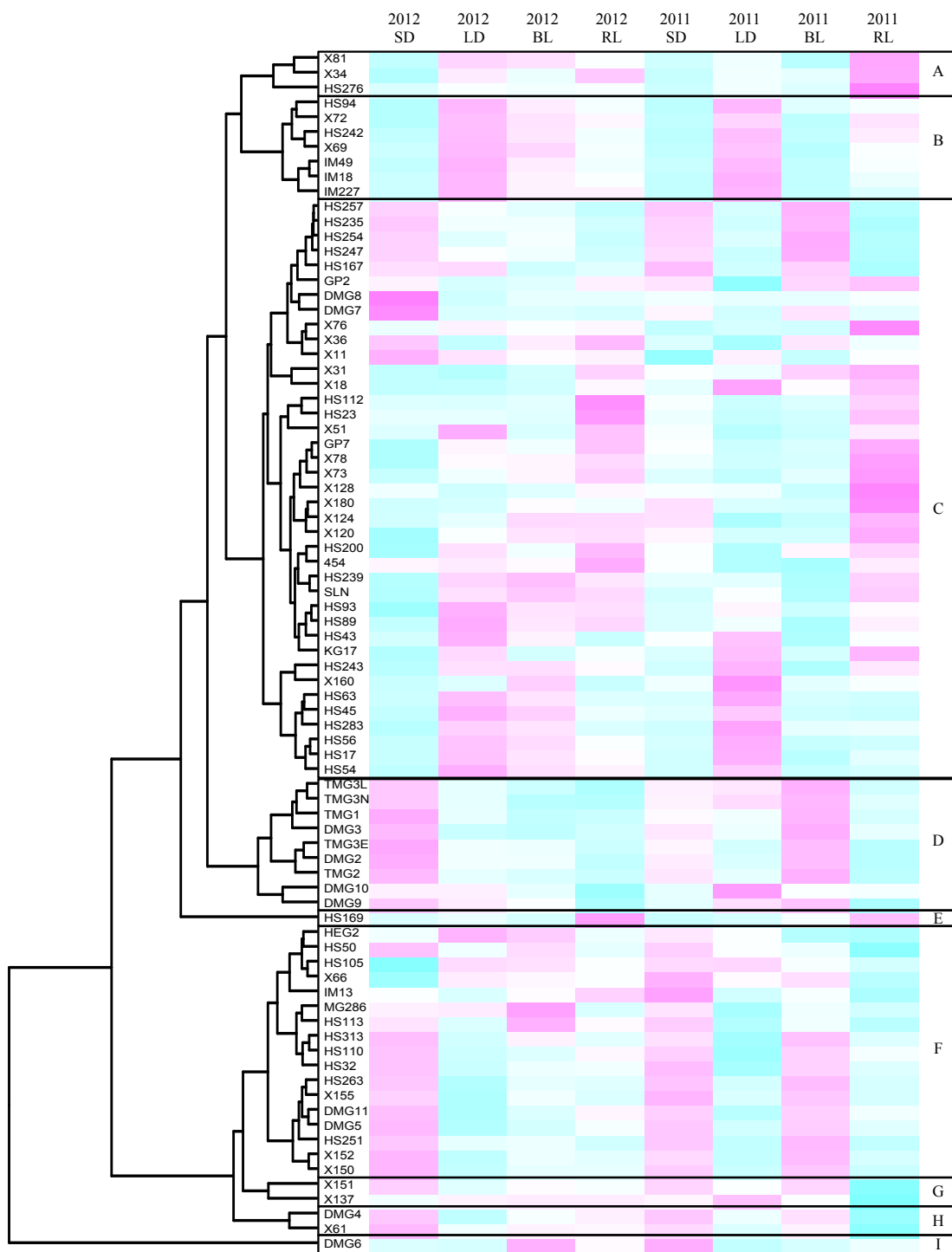


図2-6 8光環境条件を用いた供試材料のクラスター分析

ヒートマップは赤いほど大きい変数、青いほど小さい変数であることを表す。

分類された。クラスターGとクラスターHはいずれも2系統の非感光性遺伝子で構成されているが、クラスターFには赤色光によって出穂遅延する系統で構成されるのに対して、この2つのクラスターGおよびHでは赤色光に対して出穂遅延する系統は含まれなかった。またクラスターHは発色団合成酵素である *Se13* を欠損した X61 (*se13*) と DMG4 (*se13 ghd7*) で、クラスターIは基本栄養成長性遺伝子である *Ehd1* と *Ef7* の二重変異体である DMG6 (*ehd1 ef7*) で構成されていた。

### 2.3 考察

本実験によって、全81系統を9つのクラスターに分類できた。基本栄養成長性突然変異系統はクラスターAとBに、感光性突然変異系統はクラスターF、GおよびHに *Ehd1* 座欠損突然変異系統はクラスターD、EおよびIに個別に分配され、感光性や基本栄養成長性の突然変異体とは異なる表現型を持った系統はクラスターCに分類された。また、*Ehd1* 座の機能欠損型対立遺伝子を持つ系統群は独立したクラスターを形成していた。既知の花成関連遺伝子の機能喪失型対立遺伝子を持つ系統 HS169 (*ehd1*)、HS276 (*ef7*)、*Ehd1* および *Ef7* の二重変異体である DMG6 が含まれていた。HS276 を含む基本栄養成長突然変異系統の多くがクラスターAまたはクラスターBに分類されたのに対し、HS169 と DMG6 はそれぞれが単独のクラスターを形成したほか、*ehd1* と感光性遺伝子の多重変異体もひとつのクラスターを形成した。*Ehd1* は花成ホルモンの発現を誘導する花成促進因子でイネに特異的に存在する遺伝子である。*Ehd1* は多くの花成制御遺伝子によって発現を制御されることから (Xue *et al.* 2008, Ryu *et al.* 2008, Matsubara *et al.* 2008, 2011, Lee *et al.* 2009)、花成制御を決定づけるキー因子であると考えられて

いる。*Ehd1* が欠損することはイネの出穂制御に深刻な影響を及ぼすと考えられるが、本実験によって *Ehd1* 座がイネの花成制御に与える影響がその他の基本栄養成長性遺伝子と一線を画することが表現型からも裏付けられた。

本実験では年度と播種の時期をずらして、温度環境が異なる短日条件と長日条件でのイネを育成した。その結果、2011 年度と 2012 年度では同じ日長条件下でも到穂日数が 2011 年度で早まる傾向が得られた。これは、2011 年度では播種後 15 日から 45 日にかけての時期に高温にさらされたことに起因すると考えられる。短日条件下での 2011 年度と 2012 年の到穂日数では、高温による到穂日数の早生化程度は系統間で差が認められなかった (図 2-3A)。しかし、長日条件では、主に晩生系統において高温による早生化傾向が弱まり、むしろ 2012 年度の低温環境で出穂が早まった系統が存在した (図 2-3B)。この系統群のうち、遺伝子型がわかっている系統は 4 系統あり (DMG3, DMG10, TMG1, TMG3)、その全てが *Ehd* および *Hdl* または *Ghd7* の機能が欠損している多重変異体であった。このことから、*Ehd1* と感光性遺伝子がイネの温度応答性に関与する可能性が考えられる。

本実験内で供試した *Hdl* の突然変異系統は、*Hdl* 座に異なる突然変異型対立遺伝子を持ち、感光性や収量性が異なる可能性が提示されている (Xu 2014)。しかし、本実験では各系統は同一のクラスターに分類されたように、よく似た光応答性を持つという結論となった。これは、同一遺伝子座内の対立遺伝子の違いが光応答性に与える影響は異なる遺伝子座間に生じた遺伝子多型が光応答性に与える影響よりも小さいことを示唆している。クラスター F には *Hdl* と *Ghd7* の突然変異系統以外にも原因遺伝子が未知の突然変異系統が多数含まれている。これらの原因遺伝子は *Hdl* や *Ghd7* と極めて近い機能を持つ遺伝子座上か、もしくは *Hdl* 座や *Ghd7*

座上に突然変異遺伝子を持つ可能性が高い。表現型調査とクラスター分析の組み合わせによって原因遺伝子の推定が行えるようになれば花成制御経路に関する新規遺伝子の検出の効率化が可能となるため、原因遺伝子推定の精度の検証と向上が今後の新たな課題である。

当研究室では既知開花期関連遺伝子の多重変異体を多数作出して開花期特性を調査してきた。*Hdl* 座と *Ghd7* 座に機能欠損型対立遺伝子を持つ DMG5 を短日条件と長日条件の 2 条件下での到穂日数を比較した結果、両者でほとんど変わらないことから、通常の長日条件下では DMG5 では感光性はほぼ喪失していると考えられた (図 2-7)。しかし、16 時間日長や 24 時間日長といった超長日条件下において到穂日数を調査すると短日条件よりも有意に出穂が遅延することから、超長日条件下では DMG5 はまだ感光性を発揮していることがわかる (図 2-7)。このことから、イネの感光性には *Hdl* や *Ghd7* に依存しない経路が存在しており、短日条件下と長日条件下での開花期には効果が現れないと考えられる。しかし、未知の感光性制御経路に変異を持つ系統が本実験内に供試されていた場合、青色光や赤色光を照射した特殊な光環境条件下で *Hdl* や *Ghd7* が欠損した突然変異系統とは異なる特徴的な光応答性を示す可能性がある。本実験において通常とは異なる光応答性を示した系統は複数存在したが、その中でも特徴的な光応答性を示したのが HS112 である。この系統は長日条件下や自然日長条件下では *Hdl* や *Ghd7* の突然変異系統と同様に早生化していることから、感光性突然変異系統として扱われていた (図 2-8A, B, C)。しかし、赤色光照射条件においては野生型よりも *Hdl* や *Ghd7* の突然変異系統が野生型よりもやはり光応答性が弱いのにに対し、HS112 は野生型よりも強い赤色光応答性を示した (図 2-8A, B, C)。このことから、HS112 は HS110 や HEG2 と同じく非感光性の突然変異系統と考えられるものの、その表現型の違いから *Se14* は *Hdl* や *Ghd7* とは異なる機能を持

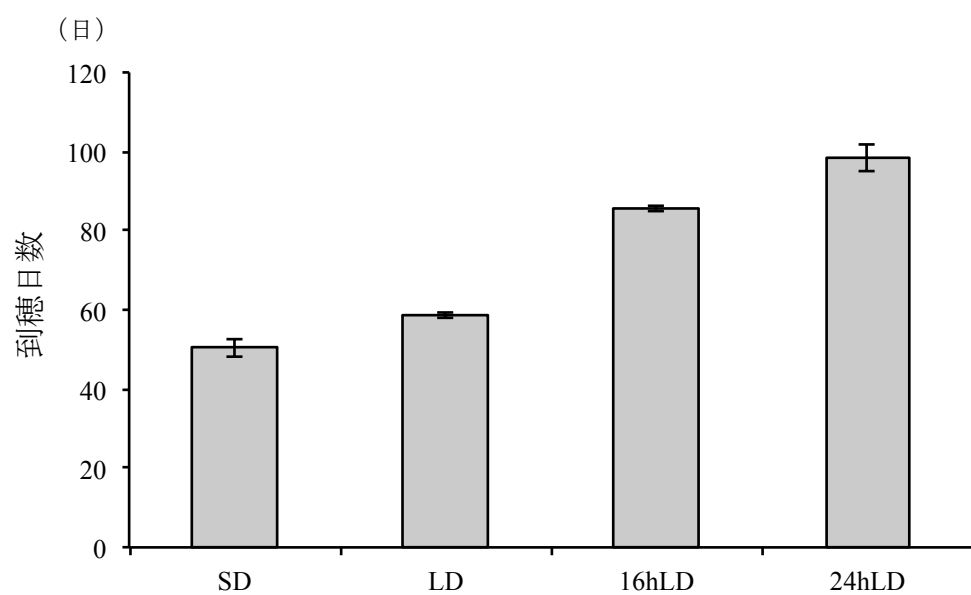


図2-7 二重劣性系統DMG5の日長反応性

SD、LD、16hLDおよび24hLDにおけるDMG5 (*hdl ghd7*) の開花期形質。5個体2反復で到穂日数を調査し、平均値と標準偏差を算出。

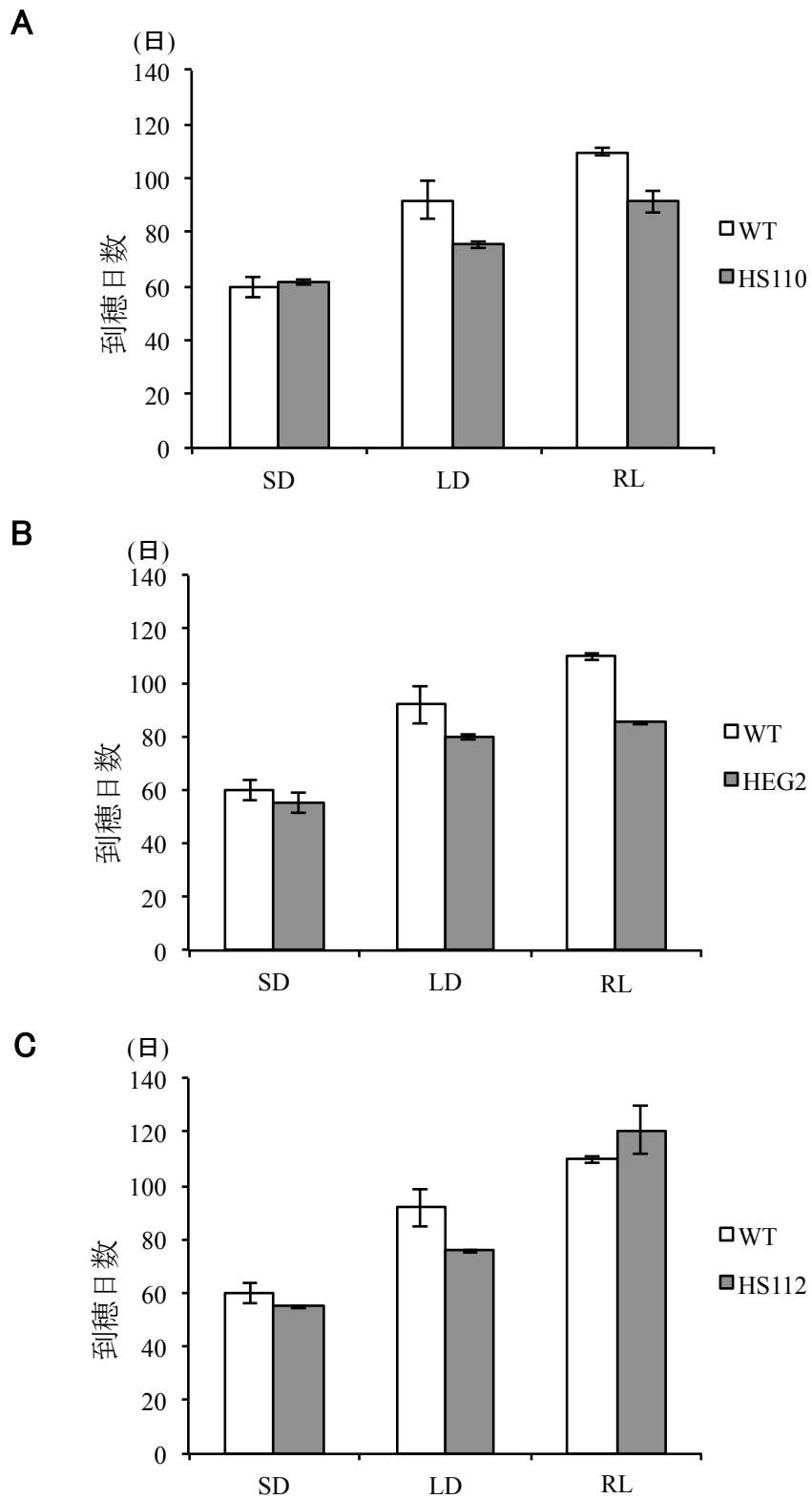


図2-8 感光性突然変異系統の開花期形質

A. B. C. HS110 (*hd1*)、HEG2 (*ghd7*)、HS112 (*se14*) と銀坊主 (WT) の開花期形質の比較。左から2012SD、2012LDおよび2012RLにおける到穂日数。

つことが予想される。HS112 の原因遺伝子を特定しその機能を解明すれば、従来の経路とは異なる未知の花成制御経路が明らかになると期待できる。第3章からは、HS112 の原因遺伝子 *Se14* の単離と機能の解析を行った。その結果、HS112 は新たな花成制御経路によって、イネの感光性に貢献していることが明らかとなった。このように、開花期突然変異系統を様々な光環境条件下で栽培し到穂日数を基にクラスター分析を行うことが、未知の感光性メカニズムの探索に有用であることがわかった。通常とは異なる環境下で遺伝的背景の異なる植物体を栽培し表現型を先鋭化させる手法は多くの研究分野に応用できる汎用性の高い手段であると考えられるため、多分野への応用の可能性を模索することが今後の課題である。



### 第 3 章

#### HS112 の原因遺伝子 *Se14* の単離と機能解析

イネの感光性は日長の長さを認識して長日条件下では花成を抑制させる分子機構によって制御されている。フィトクロム発色団合成酵素である *Se5* や *Se13* の機能を欠損したイネは感光性を喪失することから、イネの日長の認識はフィトクロムを介した赤色光シグナルが必要であることがわかっている (Izawa *et al.* 2000, Saito *et al.* 2011)。イネに特異的な花成制御経路 *Ghd7-Ehd1-Hd3a/RFT1* 上の *Ghd7* は、長日条件下で赤色光応答的に発現するとともに、赤色光依存的に転写後制御を受けることで *Ehd1* の発現を抑制する (Osugi *et al.* 2011)。また、*Ehd1* の発現を制御する遺伝子は *Ghd7* 以外にも多数存在していることがわかっている。*Ehd2* はトウモロコシ *Indeterminate1* のオルソログで C2H2 Zinc finger ドメインを持つタンパク質をコードし、*Ehd1* の発現を誘導している (Matsubara *et al.* 2008)。また、*OsMADS50* は MADS-box ドメインを持つタンパク質をコードし、*Ehd1* の発現を *Ghd7* や *Ehd2* とは独立に誘導している (Ryu *et al.* 2008)。

これに対し、イネの花成を制御するもうひとつの経路 *OsGI-Hd1-Hd3a/RFT1* は植物に広く保存されている。*OsGI* は概日時計遺伝子群の下流に位置し、日中にピークに達する概日リズムを刻む (Hayama *et al.* 2003)。*Hd1* は長日条件下では赤色光依存的に *Hd3a* の発現を抑制する機能を持つ (Yokoi *et al.* 2005, Ishikawa *et al.* 2011)。以上のように、イネの開花期制御機構では、*Hd1* を介する経路と *Ghd7* を介する経路の 2 つの独立した赤色光依存的経路が感光性を制御し

ている。

特徴的な赤色光応答性を持つことが明らかとなった開花期突然変異系統 HS112 は、第 3 染色体上短腕部の *Se14* 座の単一の劣性遺伝子 *se14* によって早生化していることがわかっている(浅見 2009)。本章は HS112 の感光性を詳細に検定するとともに、*Se14* 遺伝子座の同定と機能の解明を行った。

### 3.1 材料および方法

#### 共試材料

銀坊主(野生型)、HS112 (*se14*)、HS110 (*hd1*)、X61 (*se13*)、HEG2 (*ghd7*)、HS169 (*ehd1*)、DMG11 (*hd1 se14*)、DMG12 (*se13 se14*)、DMG13 (*ghd7 se14*)、DMG14 (*ehd1 se14*)および SL13 の計 11 系統を供試した。HS110、HS169 および X61 は HS112 と同じく銀坊主へのガンマ線照射によって得られた出穂期突然変異系統で、それぞれ *Hd1* 座、*Ehd1* 座、*Se13* 座に非機能型対立遺伝子 (*hd1*、*ehd1*、*se13*) を持つ。HEG2 は銀坊主ゲノム背景下で *Ghd7* 座に非機能型対立遺伝子 *ghd7* を導入した検定系統である。DMG11 (*hd1 se14*)、DMG12 (*se13 se14*)、DMG13 (*ghd7 se14*)および DMG14 (*ehd1 se14*)は HS110、X61、HEG2 および HS169 と HS112 の交雑後代を育成して得た二重変異体で、それぞれ *se14* とともに *hd1*、*se13*、*ghd7* そして *ehd1* を持っている。SL13 は染色体断片置換系統で、日本晴遺伝子背景下で第 3 染色体上短腕上に存在する *Se14* の座乗候補領域がカサラス型染色体断片に置き換えられた系統である。(Yano *et al.* 2002, イネゲノムリソースセンター: <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp>).

## HS112 の日長応答性試験

HS112 (*se14*)、HS110 (*hdl*)、HEG2 (*ghd7*)および銀坊主 (WT) を供試した。各系統 10 個の種子を 2 反復に分け、水田圃場の土で一杯にした 3.6-L ポットに播種し粒状培土で覆土した。その後、京都大学大学院農学研究科附属京都農場に設置された日長処理室にて自然光と人工光による補光によって作られた 2 つの日長条件下、16 時間明期／8 時間暗期 (16hLD ; 16 時間日長条件) および 24 時間明期 (24hLD ; 全日長条件) で栽培した。自然光の照射に加え (8:00-18:00)、白熱灯による人工光 ( $3.24 \text{ Wm}^{-2}$  at soil surface) による補光を加えた。2012 年の 5 月 21 日に播種し、2 週間後に 10 個体の中から 5 個体とした。最初に出穂が確認された日を個体ごとに記録し、播種後 150 日までに出穂しなかった系統に関しては未出穂とした。反復ごとに平均到穂日数を求め、2 反復間の平均値をその系統の到穂日数とした。

## *Se14* の染色体座乗位置の特定

先行研究において、*Se14* 座は第 3 染色体上の RM14315 と MK3\_6 の間の領域に座乗していることが明らかとなっている。*Se14* 座の候補領域を狭めるため HS112 と SL13 を交配して得られた F2 集団 96 個体を水田圃場に展開し、SSR (simple sequence repeat) マーカーと *mPing* SCAR マーカー を利用して *Se14* 座のファインマッピングを行った。*mPing* SCAR マーカーは銀坊主などの一部のジャポニカ品種特異的に転移活性のあるトランスポゾン *mPing* の挿入多型を利用したマーカーである (Monden *et al.* 2009)。候補領域をさらに狭めるために、F3 集団を翌年圃場に展開し出穂日を調査した。候補領域内の 5 つの SSR マーカーと 1 つの INDEL (Insertion and deletion) マーカーを利用し連鎖解析を行った。出穂日は第 2 章と同様の方法で調査した。*Se14*

の転写産物の cDNA 全長配列を決定するため、5'-RACE Core set と 3'-RACE Core Set (タカラバイオ) を添付マニュアルに従って *Se14* の転写産物から逆転写によって得られた cDNA の 5'側末端配列と 3'側末端配列を増幅し塩基配列を決定した。

#### *Se14* と *Hdl*、*Ghd7*、*Se13*、および *Ehd1* の相互作用の解析

HS112 (*se14*)、HS110 (*hdl*)、X61 (*se13*)、HEG2 (*ghd7*)、HS169 (*ehd1*)、DMG11 (*hdl se14*)、DMG12 (*se13 se14*)、DMG13 (*ghd7 se14*)、DMG14(*ehd1 se14*) および銀坊主 (野生型) を供試した。以上の系統を京都大学大学院農学研究科附属京都農場 (京都市、北緯 35 度 01 分) の水田圃場で栽培した。第 2 章と同様の方法で催芽した後、2013 年 5 月 29 日に上述の混合土を満たしたプラスチック製のセルトレイで 3 週間育苗した後、本田に栽培密度 30cm×10cm の 1 株 1 本植えて移植した。自然日長条件下で栽培し、各系統の到穂日数を調査した。京都は 5 月から 7 月までのイネの栽培時期は日長時間が限界日長 (約 13.5 時間) よりも長く、長日条件で推移するので長日条件とみなすことができる (Nishida *et al.* 2002)。施肥方法は、元肥のみ N 6g/m<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 8g/m<sup>2</sup> および K<sub>2</sub>O 8g/m<sup>2</sup> とし、その他の栽培法は慣習法に従った。1 系統 12 個体 2 反復計 24 個体の到穂日数を求め、その平均値をその系統の到穂日数とした。

#### X61 における *Se14* の日周変動

植物体を長日条件 (14.5 時間明期 30℃/9.5 時間暗期 25℃; 湿度 70%) に設定した人工気象器内で 30 日間栽培した。第 2 章と同様の催芽処理をした後、X61 および銀坊主それぞれ 10 個体を砂土で満たしたポットに播種し、水耕液として木村氏水耕液 B を与えた。播種後 14 日後

に、10 個体のうちから生育の悪いものを 5 個体間引きした。サンプリングは播種後 30 日に明期開始点から 4 時間のインターバルで計 7 回行い、最新展開葉 3 個体バルク/反復として 3 反復を収集した。トータル RNA をトリゾール液中で抽出し、DNA アーゼ (RNase-free DNase I、タカラバイオ)によって DNA を除去した。Transcriptor first-strand cDNA synthesis kit (Roche Applied Science) の使用方法に従って、1 $\mu$ g の RNA をアンカーオリゴ[dT]18 プライマーを用いて逆転写して cDNA を得た。ファストスタート TaqMan®プローブマスターの使用マニュアルに従い、LightCycler 1.5 (Roche Applied Science)を用いてリアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。*Se14* および *UBQ* のプライマーセットとユニバーサルプローブは ProbeFinder version 2.45 (Roche; <https://www.roche-applied-science.com/>)を元に設計した (表 3-1)。リアルタイム PCR の各遺伝子の絶対的発現量の検出と比較のため、各遺伝子断片長を連結したプラスミドを作製した。遺伝子断片は cDNA を鋳型とし、リアルタイム PCR に用いたプライマーを使って増幅し、pGEM-T Easy Vector System (Promega Corp.)を用いた TA クローニング法によって pGEM®-T Easy ベクターに導入した。検量線作成のためのテンプレートとして、このベクター溶液の  $10^7$  copy /  $\mu$ L から  $10^3$  copy /  $\mu$ L までの 5 段階希釈系列を作製し、テンプレートとして発現解析に供試した。検量線から絶対的発現量を算出し、内部標準であるユビキチンの発現量に対する比を相対的発現量とした。さらに、発現量の調査は 3 回の生物学的反復で行い平均値と標準偏差を求めた。

#### HS112 における花成関連遺伝子の発現解析

HS112 と銀坊主を上記と同様の条件で育成し、発現解析を行った。*Hd1*、*Ehd1*、*Hd3a*、*RFT1*、

表3-1 発現解析に使用したプライマーセット

遺伝子座	Forward primer	Reverse primer
<i>UBQ</i>	CTCCGTGGCGGTATCATC	TCTTCTTGCGGCAGTTGAC
<i>Ehd1</i>	CCTCCAAGTTTGGCATACTAC	TTCATCACTGTATTTGTGTCTCCA
<i>Hd3a</i>	TACTACTGCAGCGTCATTTGG	GGAACAGCACGAACACCAG
<i>RFT1</i>	GAGCCCAAGCAACCCTAAC	CGTAGCACATCACCTCTTGC
<i>Ghd7</i>	GAGGGAGGCCAAGCTGAT	ACCGGATTTGCTTCTCGTAG
<i>Hd1</i>	ATGGAGTTGTGGGAGCAGAC	CGCCTCCATTGATGAGAAAG
<i>Ehd2</i>	AGGCGCACGTCAAGAACT	AAGGCCCTGTGTGTCAGC
<i>OsMADS50</i>	TTCGAGCTCTCCGTCCTCT	TCAATTGTTTTCTGCGTACTGG
<i>OsMADS51</i>	CAAGCTCTACGAGTACTCCTCCTC	TGTACTTCCTTCGTTCAAGTCTC
<i>Se14</i>	GCTTCCGTGCTCTCCTAATG	CAGGGCTGGACGATCTATTG

*Ghd7*、*Ehd2*、*OsMADS50* 及び *UBQ* のプライマーセットとユニバーサルプローブは ProbeFinder version 2.45 を元に設計したものを使用した（表 3-1）。

#### HS112におけるH3K4のメチル化状態の解析

HS112および銀坊主の種子を上記と同様の方法で催芽した後、プラスチック製セルトレイに砂を詰め、1セルごとに10粒ずつ播種し育成した。発芽後2週間目に5個体を残して間引きをした。インキュベーターを用いて長日条件下（14.5時間明期／9.5時間暗期）で30日間育成した後、明期開始後2時間後の植物体の展開している全葉身をバルクでサンプリングした。サンプルを細かく刻んだ後に、1%ホルムアルデヒド溶液に浸してクロスリンクを行った。液体窒素内で凍結させ細かく破碎した後、超音波破碎機によって500bp程度のDNA断片になるように破碎した。その後、クロマチン溶液にヒストンH3に普遍的に結合する抗体またはH3K4me3を特異的に認識する抗体(Abcam)を加え、Dynabeads プロテインG（Life Technologies）によって免疫沈降を行った。プロテインGビーズから抗原抗体複合体を引き剥がし、クロスリンクを解消した。プロテインアーゼKによるタンパク質分解とフェノールクロロホルムイソアミルによるタンパク質除去を施した後、DNAをエタノール沈殿で抽出した。

*Ehd1*、*Hd3a* および *RFT1* の3つの遺伝子座のDNA断片の濃度を SYBR Green PCR master mix（Roche Applied Science）を用いて、リアルタイム PCR 法によって測定した。調査した DNA 領域の数はそれぞれの遺伝子座につき 8 領域で、その内訳は転写開始点上流 2kb から 500bp おきのプロモーター領域上に 5 つと 5'UTR、第 1 エキソンに 2 つおよび第 1 イントロンに 1 つである（表 3-2, 図 3-1）。H3 抗体で免疫沈降したサンプルを内部標準とし、各 DNA 領域の存在

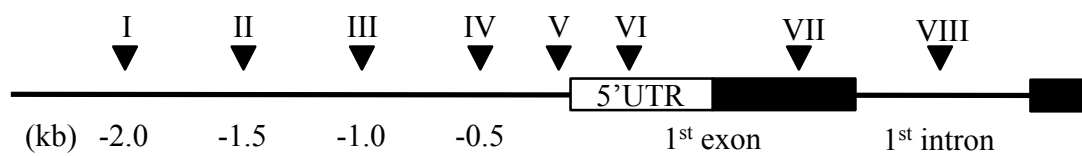


図3-1 ChIPアッセイ用プライマーセットの位置情報

ChIPアッセイに使用したプライマーセット（I-VIII）によって増幅される塩基配列の*Ehd1*、*Hd3a*、*RFT1*各遺伝子座上の位置。



表3-2 ChIPアッセイに使用したプライマーセット

遺伝子	プライマー番号	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Ehd1</i>	I	CCAAGCCGCTCTACATCATAG	GACTGGGTGCGAGAATATCAG
	II	GGCCGGAATAATGTCTAGC	TGCATGCATATGTGGAGGAG
	III	GAACACACCGCGAATTGTAG	CTGTAGCTGATCTGGCATGG
	IV	GAGCCTGGTTACCAAACAGC	CAGAGGCGATTTCGAGACAG
	V	AAGGTCTTGCATGAGACATGG	AGGCAGTACCAACCCAAGAC
	VI	TCAGAAGTAAATCTTCCATGACTG	ATAATAATGGATCACCGAGAGCTG
	VII	TGTTCTGCACTACCCTCCAAG	TCAGCTCTGTGGTTGGACTG
	VIII	TCTTGCAGAATGAGCAAACC	AGAACGTCAGAGAAGCTGTGC
<i>Hd3a</i>	I	CGCCGACATAGAAAGGAAAG	CTGTCTGCAATTCTGCGTTG
	II	TGATCAAGCATATATTCAAAGTCAAC	CCGGTCAACTAACGAAAAAG
	III	TTTCCAACGTTAGCATCCAC	TTTATACCATTTCCGTACCGTTAG
	IV	TGATGGGAGGCTATATCAACTG	GAGGAGAGATGGGATATGATCG
	V	AGGAAGACGATGCAGAAAGC	TCGAGCTGTGGTTGAGAGTG
	VI	CTGCACCACACACAGTTCAG	ACCCTACCAACCACAAGAGG
	VII	AGGGACCCTCTTGTGGTTG	CATTGGACACGGTCTTGAG
	VIII	TACTGCAGCGTCATTTGGTC	TGTGGTGGTGAAGGATGATG
<i>RFT1</i>	I	CCAAGCCGCTCTACATCATAG	GACTGGGTGCGAGAATATCAG
	II	GGCCGGAATAATGTCTAGC	TGCATGCATATGTGGAGGAG
	III	GAACACACCGCGAATTGTAG	CTGTAGCTGATCTGGCATGG
	IV	GAGCCTGGTTACCAAACAGC	CAGAGGCGATTTCGAGACAG
	V	AAGGTCTTGCATGAGACATGG	AGGCAGTACCAACCCAAGAC
	VI	ATTGAACGGCAGGAGATACC	CAGCTAACCCACTAACTTATGAAGC
	VII	GGACGATCCTCTTGTGGTTG	ATTGGAGACGATCCTTGCAC
	VIII	CCTGGTACCACTGGAGCAAC	AGACGAATGGTCAAATGTTGG

量を相対的に算出した。

### 3.2 結果

#### HS112 の日長応答性試験

HS112 の感光性を詳細に検証するために、HS112 と銀坊主を通常よりも日長時間の長い超長日条件下で栽培し、到穂日数を調査した。さらに他の非感光性突然変異系統との比較のため、HS110 (*hd1*) および HEG2 (*ghd7*) についても同様に到穂日数を調査した。その結果、16hLD 条件と 24hLD 条件では HS110 と HEG2 がそれぞれ 97.6 日・118.0 日と 114.5 日・131.0 日に出穂したのに対し、HS112 と銀坊主は 150 日経過しても未出穂だった (図 3-2)。

#### *Se14* の染色体座乗位置の特定

HS112 と染色体断片置換系統 SL13 を交配して得られた F2 集団 96 個体を圃場に展開し到穂日数を調査するとともに、SSR マーカーと *mPing* SCAR マーカーを使い遺伝子型多型調査を行った。その結果、*Se14* の候補領域を RM14388 と MK3\_6 物理的距離約 1Mb に狭めることができた (図 3-3A)。さらに、翌年に F3 集団を展開し、5 つの SSR マーカーと 1 つの INDEL マーカーを追加して候補領域の絞り込みを行い、46kb まで候補領域を狭めた (図 3-3B)。そこで、この領域内の HS112 の塩基配列を野生型のものと比較したところ、唯一の多型として 23bp の欠失が確認された。Annotation Project Database (RAP-DB) (<http://rapdb.lab.nig.ac.jp>)によると、この欠失はシロイヌナズナの花成関連遺伝子 *ELF6* と高い相同性を示す遺伝子座 Os03g0151300 内の第一エクソン上に存在しており、フレームシフトを引き起こして終止コドンを形成する

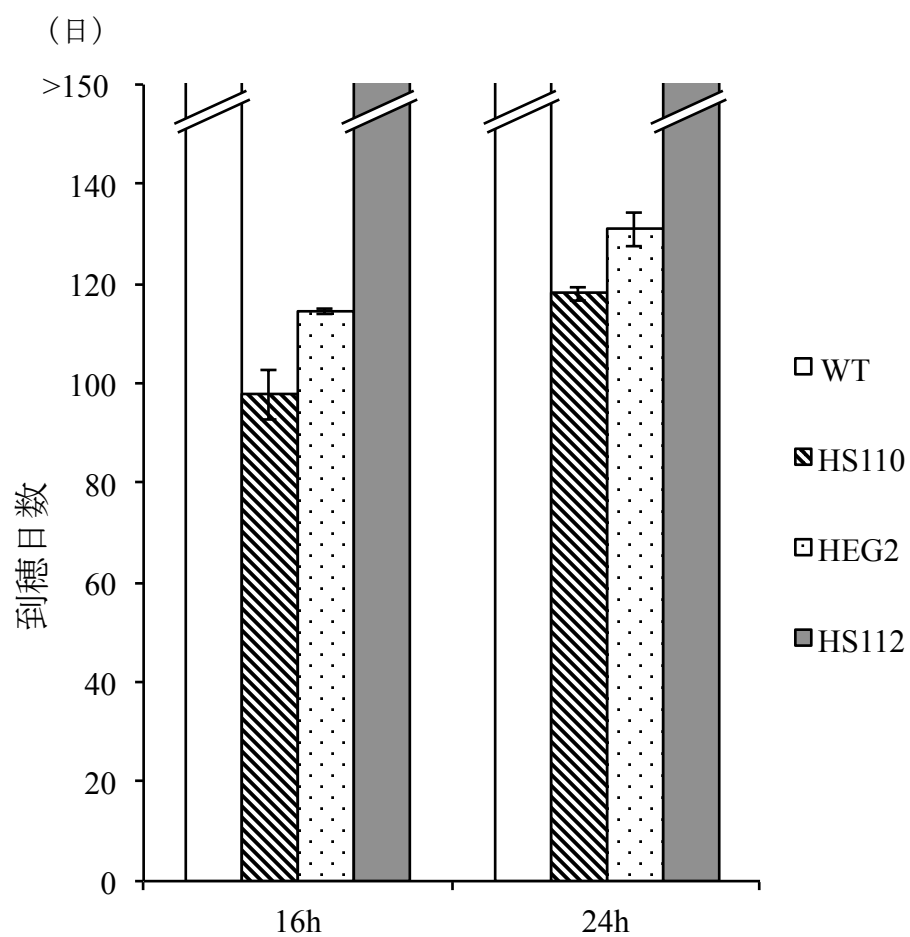


図3-2 銀坊主とHS112の感光性

HS110 (*hd1*)、HEG2 (*ghd7*)、HS112および銀坊主の16hLDおよび24hLDにおける開花期形質の比較。5個体2反復で到穂日数を調査し、平均値と標準偏差を算出。

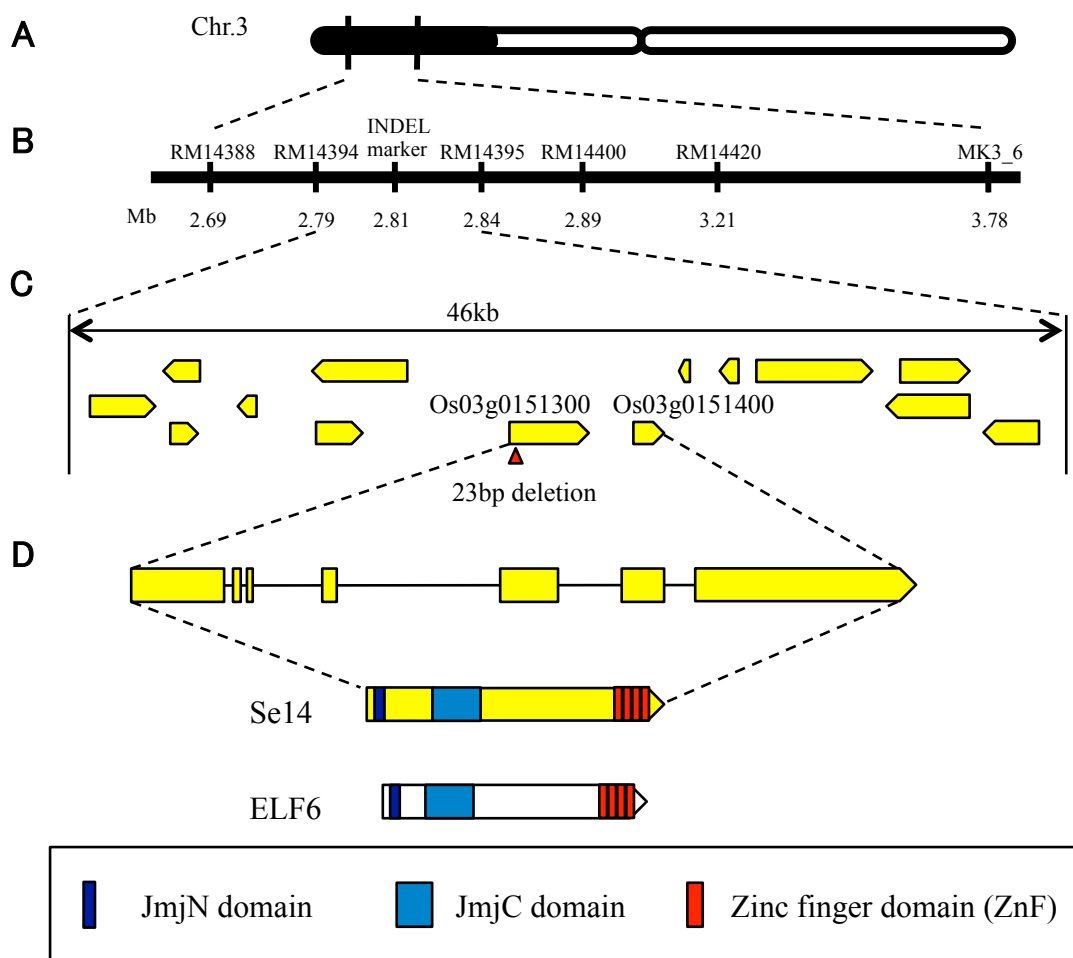


図3-3 *Se14*遺伝子座の座乗位置および構造

- A. *Se14*の染色体座乗位置。  
 B. *Se14*の候補領域とマーカーの位置情報。  
 C. 候補領域内の遺伝子の配置 (RAP-DB; <http://rapdb.lab.nig.ac.jp>)。  
 D. *Se14*の遺伝子構造および*Se14*タンパク質構造とELF6タンパク質構造の比較。

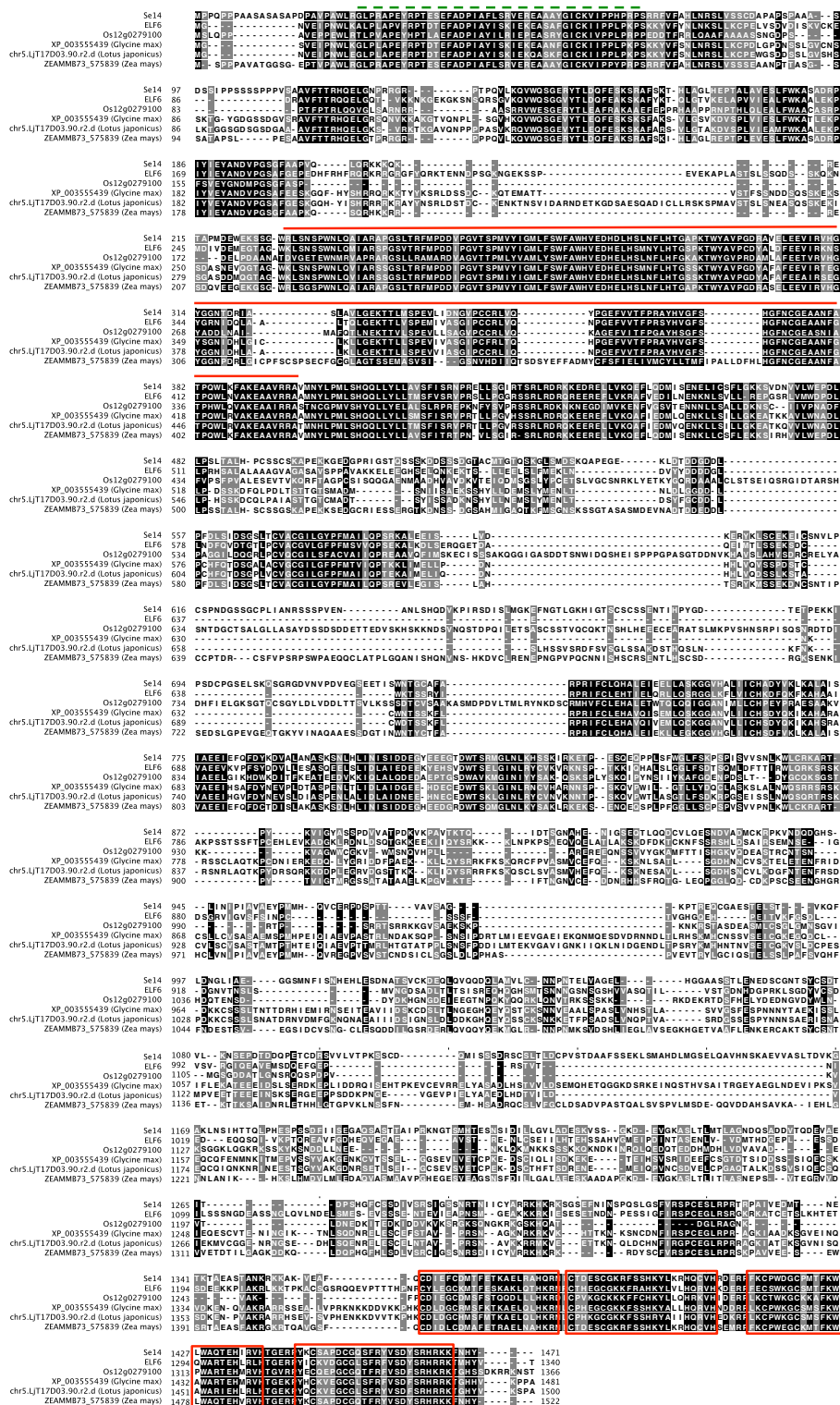


図3-4 ELF6と相同性の高い植物由来のタンパク質のアラインメント

各タンパク質の遺伝子座名とIDはGeneBank IDに準拠。

点線、実線、枠はそれぞれmjmcドメイン、 jmjCドメインおよびZinc fingerドメインの位置を示す。

(図 3-3C)。以上のことから、*Se14* は遺伝子座に座乗していること、HS112 の持つ *Se14* 遺伝子は機能喪失型対立遺伝子であることがわかった。

さらに Os03g0151300 から転写された転写産物の配列を決定するために、5'-RACE と 3'-RACE をそれぞれ行った。その結果得られた cDNA は Os03g0151300 を鋳型とする配列に加え、Os03g0151300 に隣接する Os03g0151400 の配列を含む全長約 4600bp のものであった。この転写産物がコードするタンパクは、ヒストン脱メチル化活性に関わる 2 つのドメイン Jumonji C (JmjC) ドメインと Jumonji N (JmjN) ドメインを N 側末端に持ち、DNA 結合ドメインである Zinc フィンガードメイン (ZnF) を C 側末端に持つヒストン脱メチル化酵素様タンパクであり、ELF6 と高い極めて高い相同性を示した (図 3-3D, 3-4)。

#### *Se14* と *Hdl*、*Ghd7*、*Se13*、および *Ehd1* の相互作用の解析

*Se14* 遺伝子座とその他の花成関連遺伝子座の関連を検証するため 4 つの二重変異系統の到穂日数を調査した。二重変異体のうち、早生化遺伝子を 2 つ持つ DMG11 と DMG13 は、それぞれの単一変異体である HS112、HS110 と HS112、HEG2 よりも早生化した (図 3-5 A, B)。また、早生化遺伝子 *se14* と晩生化遺伝子 *ehd1* を併せ持つ DMG14 は HS112 と HS169 の中間型を示した (図 3-5C)。このことから、*Se14* の機能は *Hdl*、*Ghd7* と *Ehd1* とは独立の経路で働くことが示唆される。一方、*Se14* 座と *Se13* 座とに突然変異対立遺伝子を持つ DMG12 は X61 とほぼ同じ到穂日数を示した (図 3-5D)。この結果から、*Se14* の開花期制御機能は *Se13* が機能欠損した場合は発現しないものと考えられた。*Se13* はフィトクロムモビリンシンターゼをコードし、フィトクロムの活性化に必須の遺伝子である。よって、*Se14* の花成制御機能は赤色光に依存的

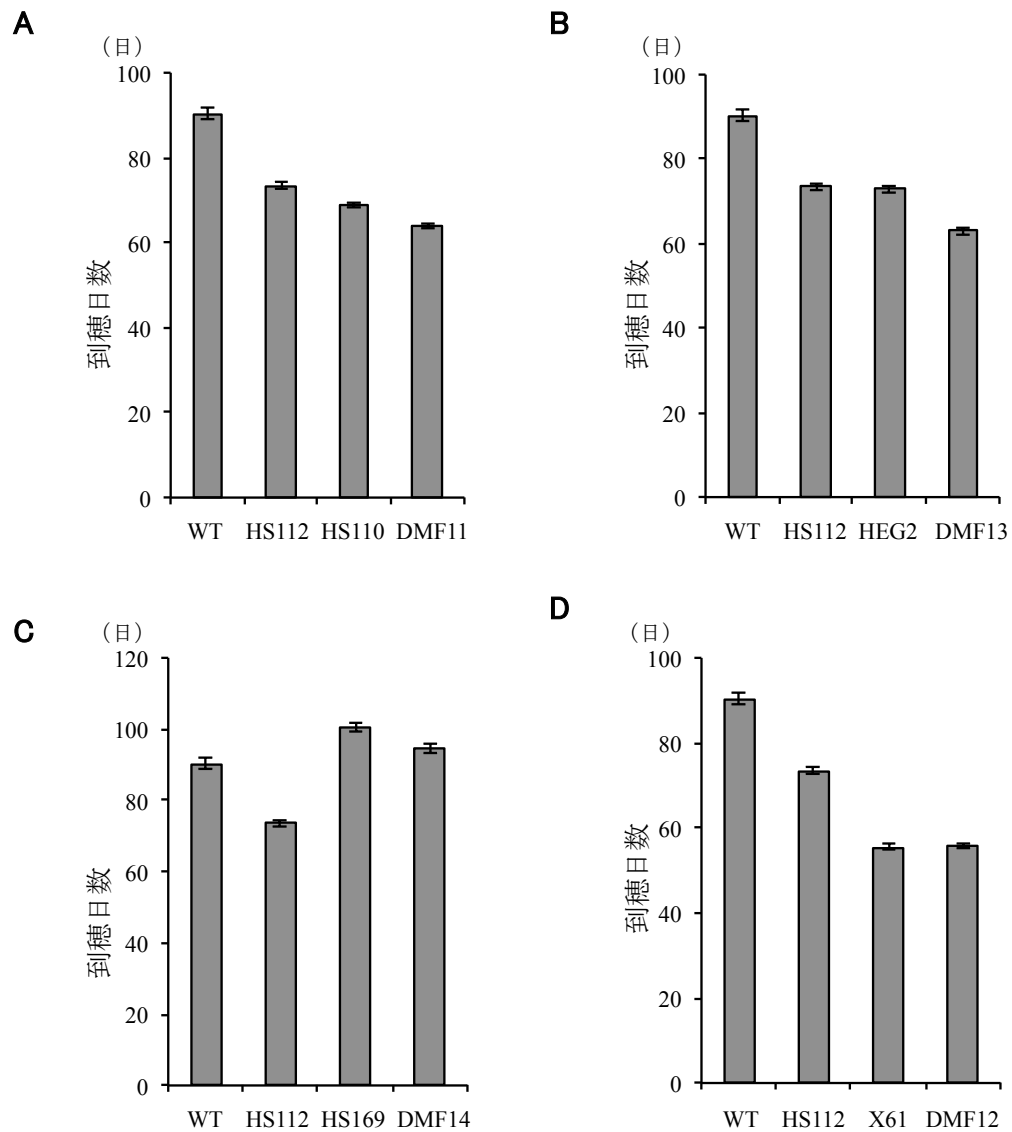


図3-5 *Se14*と他の開花期関連遺伝子の相互作用

A. B. C. D. HS112(*se14*)とHS110(*hd1*)、HEG2(*ghd7*)、HS169(*ehd1*)およびX61(*se13*)の間で交配して作出した二重変異体DMG11 (*se14 hd1*)、DMG13 (*se14 ghd7*)、DMG14 (*se14 ehd1*)、DMG12 (*se14 se13*) の自然日長条件下での到穂日数の比較。

であることが示唆された。

#### X61 における *Se14* の日周変動

多重変異体の調査によって、*Se14* による花成抑制効果は *Se13* 依存的であったことから、*Se14* の遺伝子発現がフィトクロムからのシグナルに依存的である可能性が考えられた。そこで、X61 と銀坊主での *Se14* の遺伝子発現を調査し、*Se14* の遺伝子発現が *Se13* の機能によって受ける影響を検証した。その結果、*Se14* の発現量は明期を中心に X61 で銀坊主よりも低くなった（図 3-6）、このことから、*Se14* の遺伝子発現はフィトクロムからの赤色光応答シグナルによって誘導されていることがわかった。

#### HS112 における花成関連遺伝子の発現解析

長日条件下における HS112 の早生化の原因を探るため、HS112 と銀坊主において長日条件下での主要花成関連遺伝子の遺伝子発現の日周変動を調査した。HS112 の銀坊主の間で各遺伝子の発現量を比較したところ、HS112 の *Ehd1* の発現は明け方頃にピークを迎えるが、野生型においてはそのようなピークは見られず発現レベルは低いままであった（図 3-7 A）。また、HS112 においては *RFT1* の発現レベルが日中に高まっていたが、野生型では発現レベルの上昇は見られなかった（図 3-7B）。一方で、*Hd3a* や主要な感光性遺伝子である *Hd1* や *Ghd7* に関しては、HS112 と野生型の間に発現パターンの変化は見られなかった（図 3-7D, E）。また、興味深いことに、*Ehd1* の発現制御因子として知られる *Ehd2* や *OsMADS50* の発現レベルに関しても、両者に差は見られなかった（図 3-7F, G）。これらの結果から、*Se14* の機能は直接的制御・間接的制



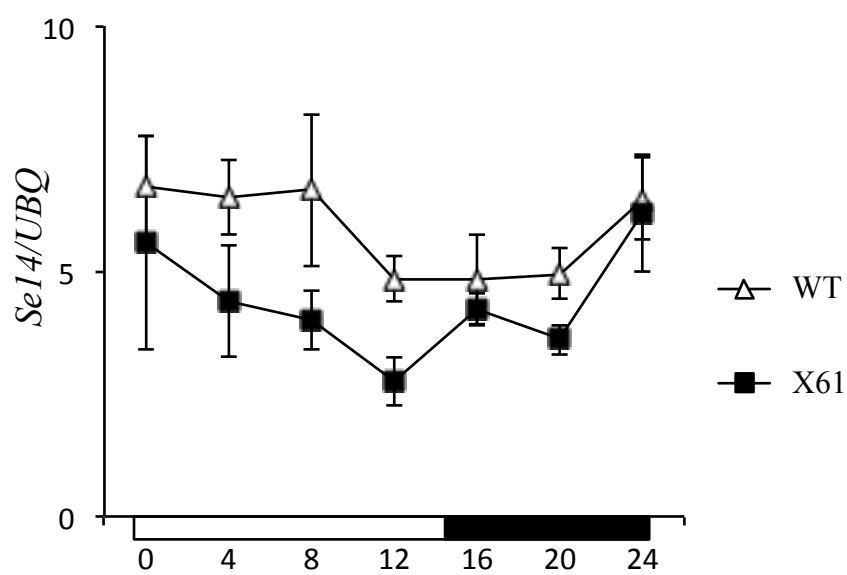


図3-6 X61における*Se14*の遺伝子発現

X61 (*se13*) および野生型 (WT) における*Se14*の遺伝子発現の日周変動の比較。

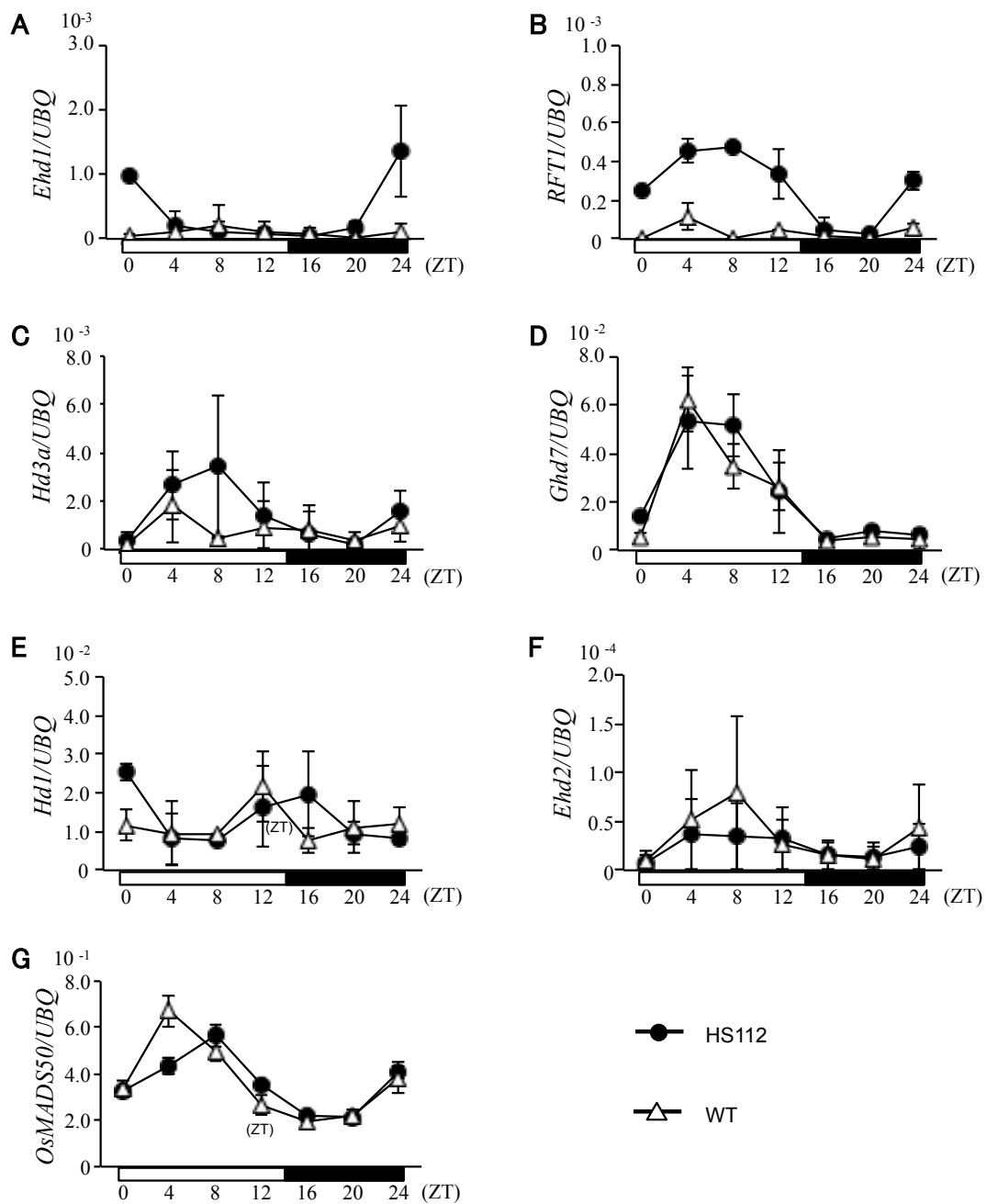


図3-7 HS112と野生型における開花期関連遺伝子の発現解析

A. B. C. D. E. F. G. 長日条件下で育成されたHS112および野生型の *Ehd1*、*Hd3a*、*RFT1*、*Ghd7*、*Hd1*、*Ehd2*、*OsMADS50*の播種後30日における日周変動の比較。

御のいずれかによって *Ehd1* と *RFT1* の発現を負に制御することであると示唆された。

### HS112 における H3K4 のメチル化状態の解析

ヒストンのメチル化レベルはクロマチンの折りたたみ構造を決定し、近傍に座乗する遺伝子の発現レベルを左右する。*Se14* はアミノ酸配列からヒストン脱メチル化活性を持つと考えられるため、*Ehd1* や *RFT1* の転写レベルを近傍ヒストンの脱メチル化によって抑制していることが期待される。そこで、この3つの遺伝子座の転写開始点上流 2kb 上に存在するヒストンのメチル化程度を ChIP アッセイによって解析した。その結果、*Ehd1* 座や *Hd3a* 座に関しては、HS112 と野生型の間にヒストンのメチル化程度の明瞭な差異は確認されなかった (図 3-8A, B)。その一方で、*RFT1* プロモーター上の II と III の2つの領域におけるヒストン H3K4me3 レベルが、HS112 において野生型よりも高度に蓄積していることが確認された (図 3-8C)。このことから、*Se14* は *RFT1* 遺伝子座上流のヒストンの脱メチル化によって *RFT1* の転写量を直接的に抑制していると考えられた。

### 3.3 考察

本実験によって、早生化突然変異系統 HS112 は感光性に関わる新規遺伝子 *Se14* に変異が生じたためであることがわかった。感光性試験によって、*Se14* はイネの花成制御機構に関与はするものの既知の感光性遺伝子である *Hd1* や *Ghd7* とは異なる経路を介していると考えられた。連鎖解析によって、*Se14* は RM14394 と RM14395 の間の染色体上単腕約 46kb 内に座乗していることがわかった。そこで、この領域内の DNA の配列をフルシーケンスした結果、HS112

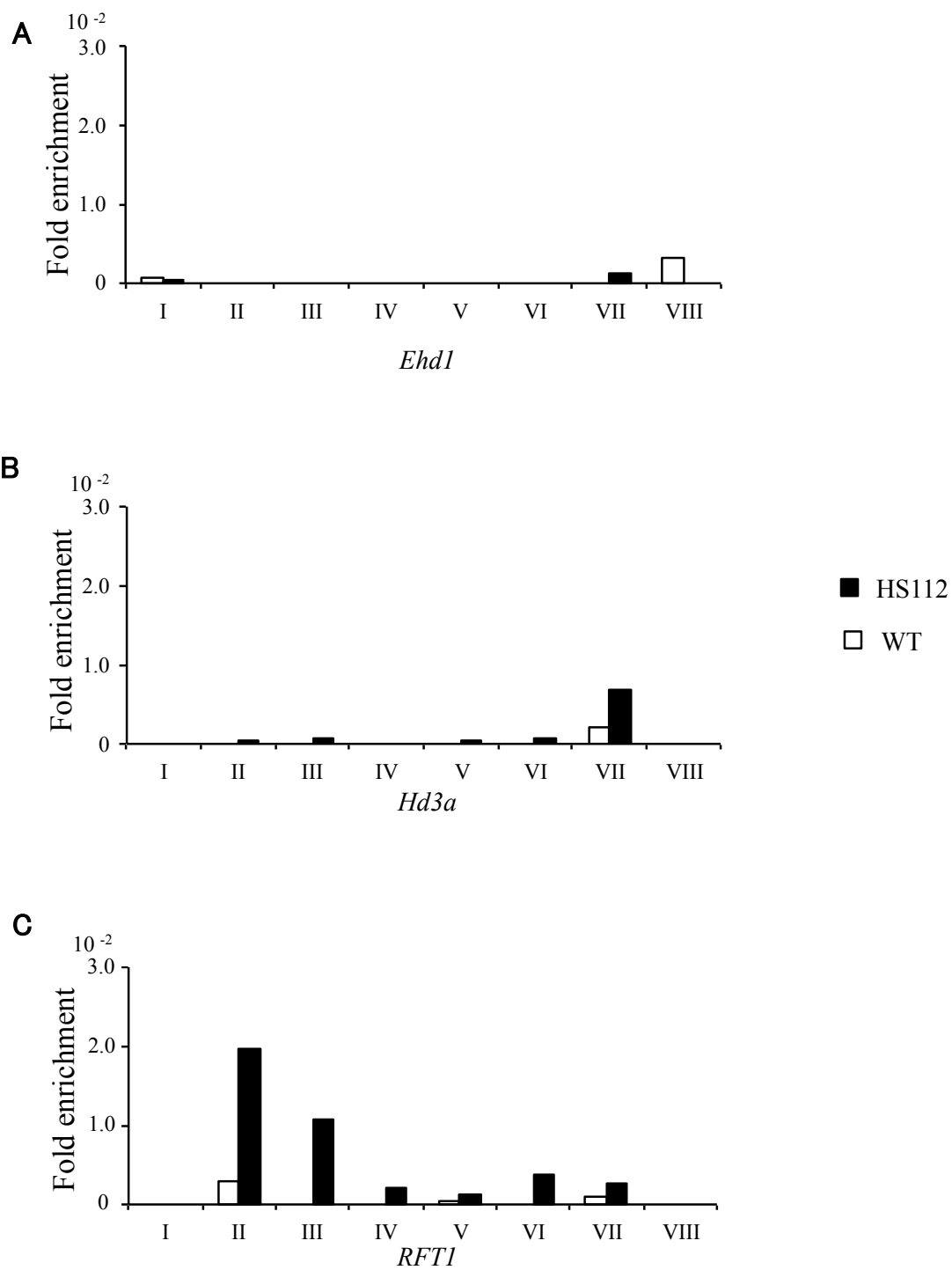


図3-8 HS112と銀坊主のヒストンメチル化状態

A. B. C. *Ehd1*、*Hd3a*、および*RFT1*各遺伝子座のヒストンH3K4のトリメチル化レベルのHS112・銀坊主 (WT) 間の比較。

は Os03g0151300 の第 1 エキソンに 23bp の欠損を持ち、フレームシフトが生じることでタンパクのドメイン構造が損なわれていることがわかった。候補領域内の多型はこれ以外には存在しなかったことから、*Se14* の遺伝子座は Os03g0151300 であること、HS112 型遺伝子 *se14* は *Se14* 座の機能欠損型対立遺伝子であると結論した。*Se14* は JmjN ドメインと JmjC ドメインを N 末端側に 4 つの ZnF ドメインを C 末端側に持つタンパクをコードしている。多重変異体を利用した相互作用の検証や発現解析の結果から、*Se14* は *Hdl*、*Ghd7* そして *Ehd1* とは独立的に花成を制御していることが示唆されたが、*Se13* に対しては依存的事であることがあった。また、*Se13* が欠損した突然変異体である X61 を用いた発現解析の結果から、*Se14* の発現量が X61 で減少していることが確認された。このことから、*Se14* の発現は赤色光シグナルの制御を受けていることが示された。ChIP アッセイの結果、HS112 の *RFT1* 遺伝子プロモーター近傍において高レベルにメチル化されたヒストン H3K4 を確認したことから、*Se14* は *RFT1* クロマチンのヒストン H3K4 の脱メチル化に働き、長日条件において *RFT1* の転写抑制することで花成を遅延させていると考えられる。以上のことから、*Se14* は赤色光に応答して発現が誘導され、*Ehd1* と *RFT1* の遺伝子発現を抑制することで花成を遅延させるが、*RFT1* の発現抑制は *RFT1* 遺伝子座のプロモーター領域のヒストン H3K4 を脱メチル化によって直接的に制御するのに対し、*Ehd1* の発現に関しては間接的に抑制していると考えられる (図 3-9)。

クロマチン構造は遺伝子の活性を制御する要素の 1 つであり、クロマチンの構造変化を支配するクロマチン修飾を研究する領域であるエピジェネティクスは近年注目を集めている。ヒストンのメチレーションの中でも H3K4 のメチレーションは花成への関与がシロイヌナズナの花成研究によって明らかになっている。JmjC ドメインを持つヒストン脱メチル化酵素で構成さ

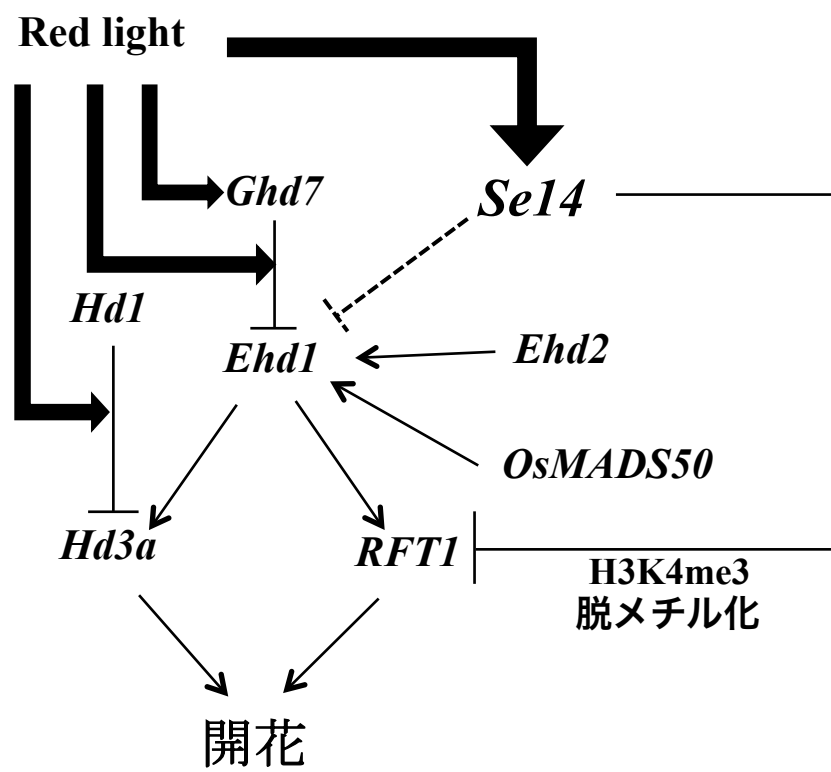


図3-9 イネの花成制御経路モデル

れる JARID ファミリーに属する *Atjmj4* と *ELF6* は、H3K4 脱メチル化酵素として *FT* 遺伝子座の近傍ヒストンを脱メチル化することで *FT* の発現を抑制している (Jeong *et al.* 2009)。また、同じく JARID ファミリーに属する *JMJ15* の過剰発現体は *FLC* 遺伝子座の近傍の H3K4me3 レベルを下げることで、*FLC* の転写レベルを低下させ開花を早めていることがわかっている

(Yang *et al.* 2012)。以上のように、JmjC ドメインを持つタンパクの多くが、花成関連遺伝子座の近傍ヒストンの修飾を介して花成制御に関与していることがわかっている。本実験は、イネにおいて、JmjC ドメインを持つタンパクが花成ホルモンをコードする *RFT1* の発現を制御していることを明らかにした初めての成果となる。本実験によって、JmjC タンパクによる H3K4 の脱メチル化がイネの花成においても重要な役割を担うことが明らかとなった。

*Ehd1* と *Hd3a* の両遺伝子座の H3K4me3 の状態が HS112 と銀坊主で変わっていなかったことから、*Se14* の脱メチル化活性は *RFT1* の近傍ヒストンに特異的であると考えられる。パラログの関係である *Hd3a* と *RFT1* はどちらもホスファチジルエタノールアミン結合タンパクをコードし花成ホルモンとして機能するが、両者の機能分化は多様化していると考えられる (Chardon *et al.* 2005, Hagiwara *et al.* 2009)。*Hd3a* は短日条件に特異的に、*RFT1* は長日条件に特異的に、それぞれが役割を分担させている (Komiya *et al.* 2008, 2009, Tsuji *et al.* 2011)。さらに、*RFT1* の塩基配列は *Hd3a* よりも品種間差が大きいことから、イネの進化の過程で *RFT1* は *Hd3a* よりも迅速に多様化していることがわかっている (Hagiwara *et al.* 2009)。以上のことを踏まえ、*Se14* によるヒストン修飾のターゲットの特異性が日長時間に対するイネの応答性の変化を生み、イネの感光性を制御している可能性が考えられる。

*Ghd7* の発現はフィトクロムからのシグナルによって制御されているが、同時に *Ghd7* のタン

パクの持つ *Ehd1* の発現を抑制する機能にも影響を与えることがわかっている (Osugi *et al.* 2011)。Hd1 タンパクも *Ghd7* タンパクと同じく感光性遺伝子として長日条件下において花成ホルモンである *Hd3a* の発現を抑制するが、この Hd1 タンパクの活性もまたフィトクロムに依存していることがわかっている (Izawa *et al.* 2002, Hayama *et al.* 2003, Ishikawa *et al.* 2005)。石川らはフィトクロム依存的な Hd1 の *Hd3a* 発現抑制機能が限界日長の規定に重要であることを指摘している (Ishikawa *et al.* 2011)。また、伊藤らは *Ehd1* や *Ghd7* の光依存的な遺伝子発現が限界日長を決定しているとするモデルを提唱している (Itoh *et al.* 2010)。本研究において、HS112 は長日条件下において野生型よりも早く開花する早生化系統であるにもかかわらず、超長日条件や光中断条件下では出穂しないか、野生型よりも遅くなった。こうした日長条件に対する応答性の変化は限界日長の変動に伴うために生じると考えられることから、*Se14* もまた限界日長の長さを左右する因子の 1 つであることを示唆している。



## 第 4 章

### *Se14* の収量構成要素への影響の検証

イネの出穂特性は生殖生長期への移行の可否を決定しているというだけではなく、イネの収量性と強く関わるという点でも重要な農業形質である。近年、イネの開花期関連遺伝子と収量性の関連性を検証した一連の研究によって、イネの感光性遺伝子が出穂特性だけではなく収量性にも関与していることが明らかとなった。例えば、*Ghd7* の機能喪失によって一穂粒数が減少し節間の細胞数が減少して短稈化する他、分げつ数に関しては野生型よりも増大する (Xue *et al.* 2008)。また、*Ghd7* の機能喪失が二次枝梗数の減少を招いていたことから、*Ghd7* が二次枝梗の発生制御にも関与していることが示唆されている (Xu *et al.* 2014)。*Ghd7* と同様に *Hd1* が稈長や収量性に関与していることが *Hd1* の非機能型対立遺伝子を導入した準同質遺伝子系統の観察によってわかっている (Zhang *et al.* 2012)。シロイヌナズナの花成関連遺伝子の *HAP3* のオルソログである感光性遺伝子 *Heading date 5 (Hd5)* も *Hd1* 同様に多面的な機能を持ち、機能喪失型対立遺伝子の短稈化や一穂粒数の減少効果が確認されている (Yan *et al.* 2011)。以上のように感光性遺伝子は収量形質とも直接的に関与しているため、感光性遺伝子を育種に利用する上で収量性の検証は不可欠である。

*Se14* の開花期以外の農業形質に及ぼす効果を検証することは、感光性変異原として *Se14* をイネ育種に活用する上で極めて重要となる。*Se14* のホモログである *ELF6* は、ブラシノステロイドのシグナル伝達経路への関与を通してシロイヌナズナの葉身の形態などに影響している (Yu

*et al.* 2008)。このことから、*Se14* も花成制御以外の機能を持つ遺伝子の発現制御に関与することでイネの形態に様々な影響を及ぼす可能性がある。本章では、HS112 の収量性やバイオマス进行调查し、*Se14* の育種利用の可能性を検証した。その結果、HS112 は多用な農業形質で野生型よりも優れた形質を持つことがわかった。

#### 4.1 材料および方法

##### 供試材料

農業形質調査とブラシノステロイド応答性評価には HS112 および銀坊主 (WT) を供試した。

##### 農業形質調査

調査に供試した HS112 および銀坊主は 2 章と同じ条件で催芽・育苗した後、2013 年 4 月 29 日に京都大学大学院農学研究科附属京都農場の本田で栽培した。21 日間の育苗の後、植物体は 30cm×20cm の 1 株 1 本植えで移植した。施肥条件は、元肥のみの N 6 g/m<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 8 g/m<sup>2</sup> および K<sub>2</sub>O 8 g/m<sup>2</sup> とし、その他の栽培法は慣行法に従った。全個体の登熟を待った後、各系統の個体を 6 個体×2 反復を無作為に選抜し、全個体の稈長・穂数・地上部乾物重・穂長・一穂粒数・一次枝梗数・二次枝梗数・止葉葉身長・1000 粒重を調査した。反復ごとに平均値から 2 反復の平均値を系統の表現型とし、12 個体の結果を元に標準偏差を算出した。

##### 一次分げつ数、二次分げつ数の調査

上記と同様の条件で圃場において栽培された HS112 と銀坊主の成熟個体各 6 個体を抜き取り、鞘葉節冠根部を観察して、各個体の一次分げつと二次分げつの数を数え、平均と標準偏差を算出した。

#### ブラシノステロイド応答性試験

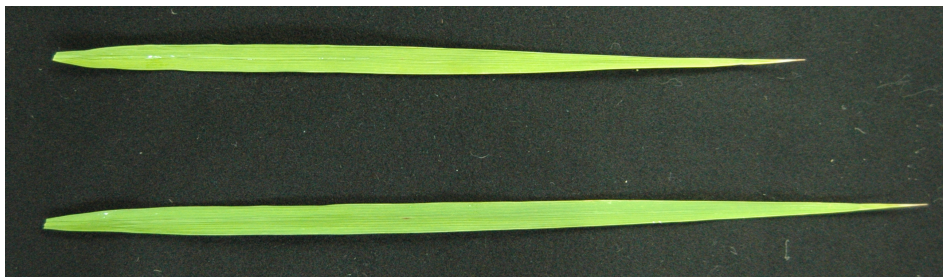
第 2 章（11 ページ）と同じ方法で催芽処理を施した HS112 および銀坊主の種子を実験に供試した。ブラシノステロイド処理区として 3 段階濃度（ $10^6$  pM,  $10^3$  pM, 1 pM）のエピブラシノリド（フナコシ）を添加した木村氏水耕液 B、またはブラシノステロイド無添加（0 pM）の木村氏水耕液 B 内で 4 週間水耕栽培した。その後、各系統 6 個体×2 反復の個体を無作為に選抜き、最大葉身長・稈長・根長を調査した。反復ごとに平均値から 2 反復の平均値を系統の表現型値とした。

## 4.2 結果

### 農業形質

収量性に関わる穂数・一穂粒数・一次枝梗数・二次枝梗数および 1000 粒重の 5 形質と、バイオマスに関わる稈長・地上部乾物重・穂長・止葉葉身長の 4 形質の合計 9 形質について HS112 と銀坊主とで影響を調査した結果、バイオマスに関わる 3 つの形質、稈長・葉身長および地上部乾物重について HS112 が野生型よりも 1%水準で有意に高い値となった(図 4-1A, 図 4-2A, B, C,)。また、収量性に関わる穂数と穂長の両形質でも HS112 が 1%水準で有意に高い値となった(図 4-1B, 図 4-2H, I)。とりわけ穂数に関して HS112 は野生型の約 1.5 倍となった。一方で、一

A



B



図4-1 HS112と銀坊主の形態

- A. 銀坊主（上）とHS112（下）の葉身の比較。  
B. 銀坊主（左）とHS112（右）の穂の比較。

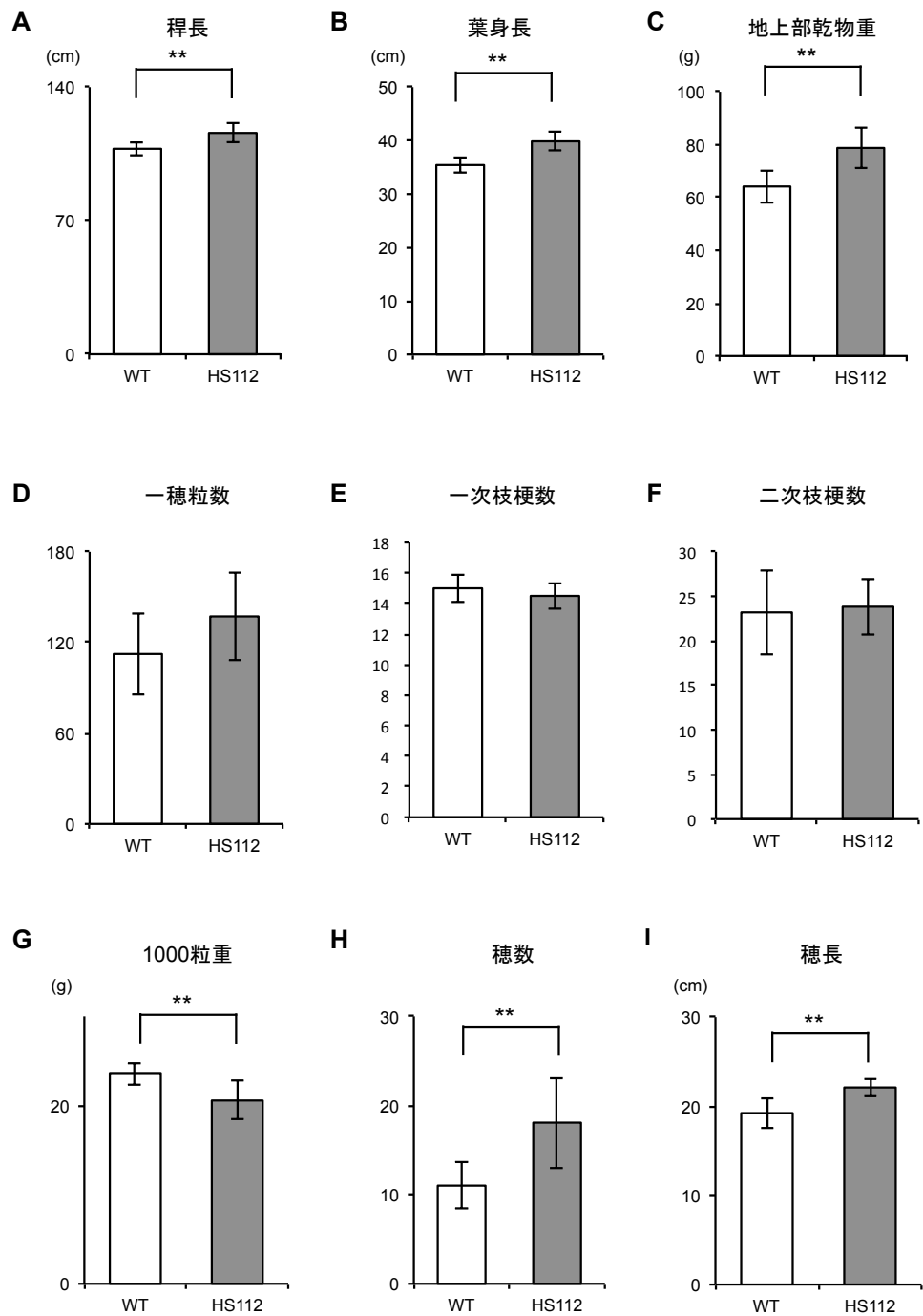


図4-2 HS112と銀坊主の各種収量構成要素

A. B. C. E. F. G. H. I. HS112および銀坊主 (WT) における稈長・葉身長・地上部乾物重・一穂粒数・一次枝梗数・二次枝梗数・1000粒重・穂数および穂長の比較。

穂粒数・一次枝梗数・二次枝梗数・1000粒重の形質に関しては、両系統間に有意差は認められなかった（図 4-2D, E, F, G）。

#### 一次分げつ数、二次分げつ数の調査

HS112 において穂数が増大した要因を検証するために、一次分げつおよび二次分げつ数を調査した。HS112 と銀坊主との間で一次分げつ数には差はなく、二次分げつ数が HS112 で増大していた（図 4-3）。以上のことから、HS112 の分げつ数の増大は二次分げつ数の増大に伴うものであると考えられた。

#### ブラシノステロイド応答性試験

Se14 のホモログである ELF6 は、ブラシノステロイド受容体と相互作用することでブラシノステロイドのシグナル伝達に関与している。また、イネにおいてブラシノステロイドの合成能や感受性が形態や収量に関与することから、Se14 も同様にブラシノステロイドのシグナル伝達に関与していること、ブラシノステロイドへの感受性が HS112 と野生型の収量構成要素の差異の原因である可能性が考えられる。そこで、ブラシノステロイドへの応答性を調査するために、ブラシノステロイドを過剰に添加した培地において HS112 と野生型を育成し、根長・第 1 葉葉鞘長および葉身長を測定した。その結果、0 pM と 1 pM では 3 形質いずれも HS112 と野生型で有意差が確認されなかった一方で、 $10^3$  pM と  $10^6$  pM においては逆に HS112 の方が野生型よりも伸長が阻害されている傾向となった（図 4-4A, B, C, 図 4-5A）。特に、 $10^6$  pM においては葉身長と根長において 1 % 水準で有意差が確認された（図 4-5A, C, 図 4-5B）。

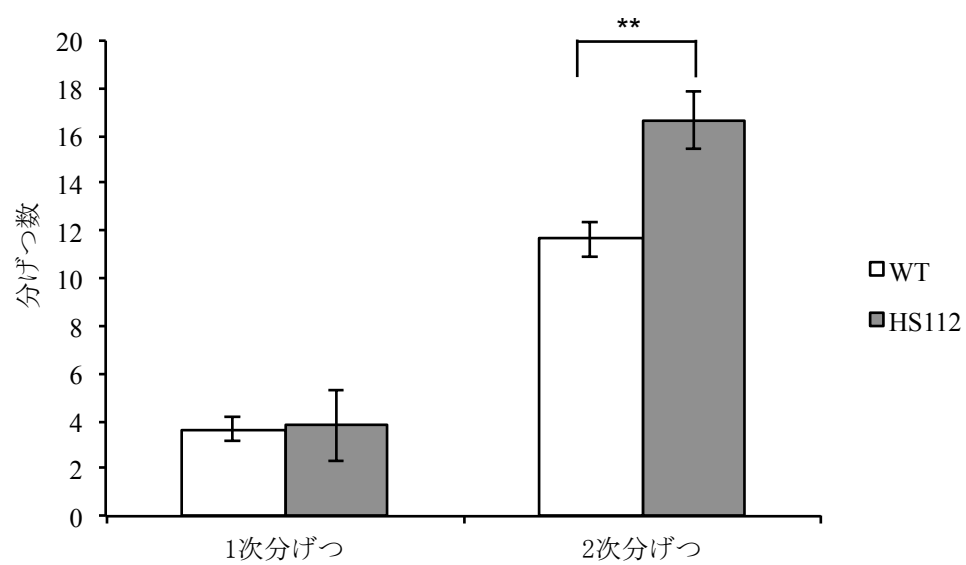


図4-3 HS112と銀坊主の分げつ構成

HS112および銀坊主（WT）の一次分げつ数と二次分げつ数の比較。

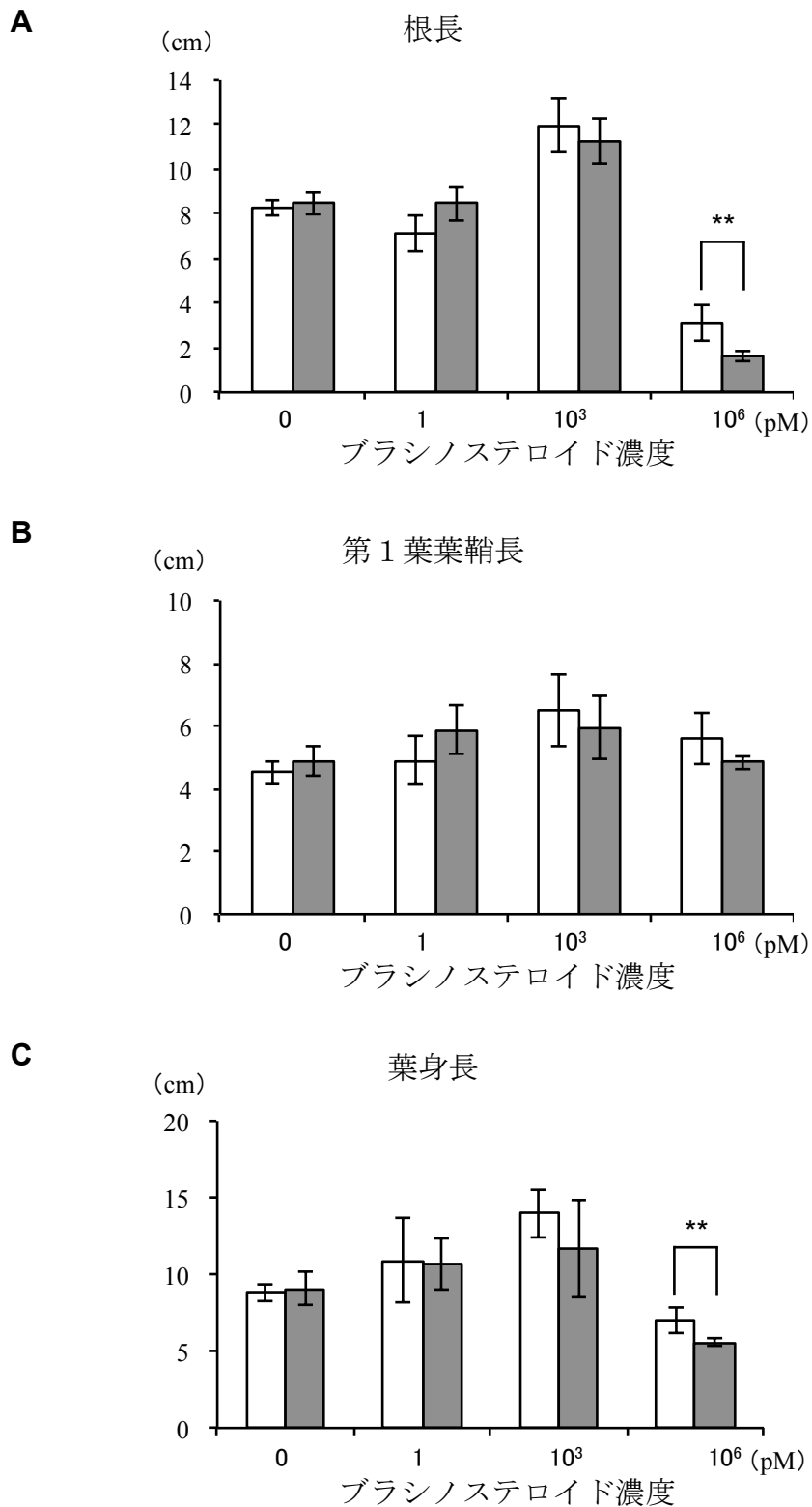
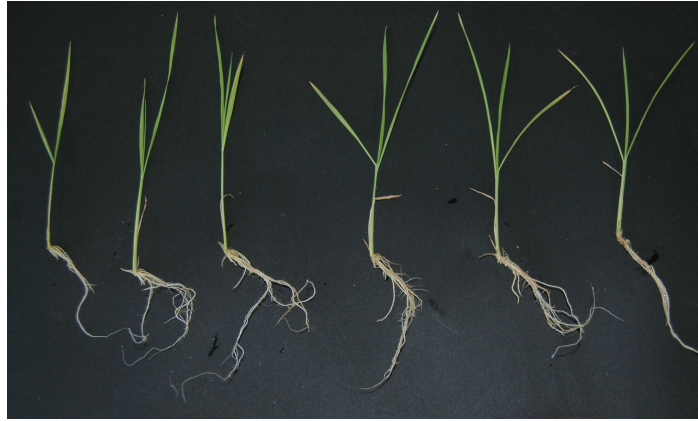


図4-4 HS112および銀坊主のブラシノステロイド応答性

A. B. C. 0pM、1pM、10<sup>3</sup>pMおよび10<sup>6</sup>pMのブラシノステロイド添加水耕液で生育したHS112および銀坊主（野生型）の根長、第1葉葉鞘長および葉身長の比較。



**A**



未処理区

**B**



$10^6$  pMブラシノステロイド処理

**図4-5 ブラシノステロイド処理したHS112および銀坊主**

- A. 通常の水耕液で生育した銀坊主（左3個体）およびHS112（右3個体）。  
B.  $10^6$ pMブラシノステロイドを添加した水耕液で生育した銀坊主（左3個体）およびHS112（右3個体）。

### 4.3 考察

ブラシノステロイドは植物の伸長成長や暗形態形成、光形態形成、細胞分裂および細胞伸長などに関与するステロイドホルモンのひとつである。ブラシノステロイドのシグナル伝達経路の下流に位置する 2 つのタンパク質 BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) と BRI1-EMSSUPPRESSOR1 (BES1) /BRASSINAZOLE RESISTANT 2 (BZR2) は、BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 (BIN2) によってリン酸化されると機能を抑制される (He *et al.* 2002, Li *et al.* 2002, Yin *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2002)。しかし、ブラシノステロイド由来のシグナルが伝達されると、BIN2 の活性が失われるとともに BZR1 と BES1 は Bri1 SUPPRESSOR1 (BSU1) によって脱リン酸化され、目的遺伝子のプロモーター領域に結合して遺伝子発現を誘導することができるようになる (Mora-Garcia *et al.* 2004, Yin *et al.* 2005, He *et al.* 2005)。ELF6 は BZR1・BES1 と相互作用して、ブラシノステロイド応答遺伝子の 1 つである *TCH4* のプロモーター領域に結合し、*TCH4* の近傍ヒストンの H3K9 を脱メチル化することで、*TCH4* の発現を誘導していることがわかっている (Yu *et al.* 2007)。*ELF6* が欠損した *elf6* では細胞伸長が小さくなり葉柄が短くなるなど部分的にブラシノステロイド非感受性様の表現型を示す (Yu *et al.* 2007)。

適量のブラシノステロイドを植物体に散布すると細胞分裂の活性化やバイオマスの増大を促し収量の向上を期待できることから、農業への利用が模索されているほか、作物育種への応用に向けた研究も進められている (Ikekawa and Zhao 1991, Khripach *et al.* 2000)。ブラシノステロイド合成経路に関わる酵素 C-2 2 ヒドロキシラーゼをコードする *Osdwarf4* を欠損したイネの突然変異体 *osdwarf4-1* は、ラミナジョイントの傾斜が垂直に近くなることで光利用効率が向上

し高収量につながった。*OsBZR1* は *BZR1* のイネにおけるホモログとして単離された遺伝子で、*BZR1* と同様にブラシノステロイド系のシグナル伝達に関与している (Bai *et al.* 2007)。*OsBZR1* がターゲットとする遺伝子のひとつに *DWARF AND LOW-TILLERING (DLT)* が報告されている (Tong *et al.* 2009)。*DLT* は GRAS ファミリーに属する遺伝子で、*DLT* の機能が欠失した変異体 *dlt* はラミナジョイントの屈曲や短く太い葉身などのブラシノステロイド欠損体にしばしば見られる表現型とともに分げつ数の減少や出穂の遅延といった形質を持つことが報告されている (Tong *et al.* 2009)。反対に *DLT* を過剰発現させた系統では、長く細い葉身やラミナジョイントの伸張などの表現型が観察されるとともに、ブラシノステロイドに対する強感受性を持つことが明らかとなった。また、*BIN2* のオルソログであるイネ遺伝子 *GSK3/SHAGGY-like kinase 2 (GSK2)* の機能解析によって、*GSK2* は *BZR1* のリン酸化を通して *DLT* の発現を抑制するとともに *DLT* もリン酸化することで *DLT* の酵素活性を抑え、ブラシノステロイドシグナル経路を負に制御していることが明らかとなった (Bai *et al.* 2007, Tong *et al.* 2012)。*GSK2* を過剰発現させた遺伝子組換え体は葉身長や草丈が短く、分げつ数が少ないなどブラシノステロイド欠損体やブラシノステロイド非感受性体と非常によく似た表現型を示すのに対し、*GSK2* の活性を RNAi 法によって抑制した遺伝子組換え体ではブラシノステロイドに対して強感受性となり葉身長の増大などの表現型を呈した。以上のように、*BZR1* を介したブラシノステロイドのシグナル伝達経路はイネにおいても保存されており、分げつ数やバイオマスの制御を通じてイネの収量性に影響を及ぼしうることが明らかとなっている。

ブラシノステロイドは適量の添加であれば植物体の生長増進に寄与するが、過剰に与えると逆に植物の成長を阻害することが知られている。本研究内でも、根長、葉鞘長および葉身長の

いずれの表現型についても  $10^3$  pM まではブラシノステロイド濃度上昇に伴う植物体の生長増進が認められたが、 $10^6$  pM まで濃度を高くすると生長遅延が確認された。HS112 と野生型間の比較の結果、0 pM および 1 pM では HS112 に対する生長促進効果が野生型よりも強いのに対し、 $10^3$  pM では野生型の成長速度がさらに高まったのに比べて HS112 は成長速度の増大は頭打ちとなり表現型の差は逆転した。 $10^6$  pM においては、HS112 および野生型いずれも  $10^3$  pM に比べ大きく生育が阻害されているが、HS112 の方が阻害の程度は大きく野生型との間に有意差が生じた。これらの結果は、HS112 がブラシノステロイドに対し強感受性であることを示唆している。この結果は、HS112 に見られた分げつ数の増大や葉身の伸長などといった表現型が、ブラシノステロイドへ強感受性を示す *DLT* の過剰発現体や *GSK2* の過剰発現体と共通していた結果と一致する。以上のことから、HS112 はブラシノステロイドに対して強感受性になることによって、分げつ数に代表される各種の収量構成要素が変異していると考えられる。

HS112 において向上していた農業形質のうち、分げつ数の増大が最も収量性への効果が大きかった。一次分げつ数と二次分げつ数の調査から、HS112 においては二次分げつ数が野生型よりも有意に増加していたことから、*Se14* は二次分げつの形成に関与している可能性が示唆される。現在、一次分げつの発生と二次分げつの発生を区別した分子生物学的な知見は乏しく、*Se14* がどのように二次分げつ数だけを制御しているかは明らかではない。本研究の結果から、イネの二次分げつ形成には *Se14* を介するブラシノステロイドによる制御が関与していると考えられることから、*Se14* がブラシノステロイドのシグナル伝達経路上に及ぼす機能を解析することでイネの一次分げつ・二次分げつの形成制御機構の解明に貢献することが期待できる。

## 第 5 章

### 総括

イネはアジアを中心とする広い地域において主食とされている重要な農業作物である。今後予測される人口増大と環境変動に向け、多様な環境下でイネを栽培できる体制を構築していく必要がある。イネの開花期は地域適応性に関わる農業形質のひとつであり、イネの栽培化の過程で地域に適応した開花期形質を持つイネが育成されてきた (Izawa *et al.* 2007)。特に、夏季の日長時間が長い高緯度地域への栽培域の拡大の過程では、多様な感光性を持ったイネ品種が育種された。イネの栽培域の北限である北海道では主要な感光性遺伝子である *Ghd7* 座に機能欠損型の対立遺伝子を持つことで感光性を大きく喪失した品種が栽培されている (Fujino and Sekiguchi 2005, Nonoue *et al.* 2008)。このように、感光性は日長時間の異なる環境への適応性に深く関わる形質なので、栽培地域に合わせた感光性を持つ品種を育成していくことがイネ育種のひとつの課題である。そのため、イネの感光性制御機構を解明することがイネの育種学の重要な使命である。現在考えられているイネの感光性制御モデルでは、イネの感光性は *Hdl* と *Ghd7* という 2 つの感光性遺伝子による花成促進因子の発現抑制によって説明される (Izawa *et al.* 2013, Tsuji *et al.* 2013)。しかし、現在の知見だけではイネの感光性を完全に説明することができないことから、未知の感光性制御経路の解明を進めていく必要がある。そこで本研究では、当研究室で保有する開花突然変異系統を利用してイネの感光性の分子メカニズムの解明を目指した。

まず、新規の感光性遺伝子を同定するため、開花期突然変異系統のスクリーニングを行った。

短日条件と長日条件のほかに赤色光や青色光を照射した光環境条件で栽培し、開花期形質によって系統分類を行ったところ、赤色光応答性が既知感光性遺伝子の突然変異系統とは異なる HS112 を見出した。そこで、次に HS112 の原因遺伝子 *se14* の単離と機能の解析を行った。その結果、*Se14* はシロイヌナズナの花成関連遺伝子 *ELF6* のオルソログであり赤色光に応答して発現が誘導されていた。また、*Se14* はヒストンの脱メチル化を介して *RFT1* の発現を抑制することで開花を遅延させていた。このように、*Se14* の機能解析を通して、クロマチン修飾を介した新たな感光性制御経路の存在を明らかにした。また、その後、*se14* が花成制御以外に分げつ数の増加やバイオマスの増大など、収量構成要素に対しても顕著な効果を持つことがわかった。また、その原因として、*Se14* がブラシノステロイドのシグナル伝達経路に関与することでイネのブラシノステロイド感受性を制御していることが考えられた。このように、本研究において、第2章で行った多様な光環境条件下での形質評価に基づいたイネ突然変異系統の分類が、新規遺伝子の同定や未知の感光性制御機構の解明に有効であることを示すことができた。

主要な花成促進因子である *Hd3a* と *RFT1* は花成ホルモンをコードするオルソログであるが、*Hd3a* が短日条件での花成誘導に関与するのに対し *RFT1* は長日条件での花成誘導に関わっている。花成ホルモン遺伝子の機能の分化はシロイヌナズナには見られないイネの花成制御の特徴で、イネの短日植物化と深く関連していると考えられている。本研究で新たに同定された *Se14* は *RFT1* の発現を抑制することによって開花を抑制している。*Se14* は *RFT1* 座のプロモーター領域のヒストンを脱メチル化したのに対し、*Hd3a* 座のヒストンのメチル化状態には効果を及ぼさなかった。このように、*Se14* は *Hd3a* と *RFT1* を区別し、*RFT1* 特異的にクロマチン修飾を行うことで、*Hd3a* と *RFT1* の機能分化に貢献していると考えられる。

*Se14* はシロイヌナズナの花成関連遺伝子 *ELF6* のオルソログであり、どちらもヒストン修飾を介して花成ホルモン遺伝子の発現を抑制している。このことから、*Se14/ELF6-RFT1/FT* という花成制御経路は *OsGI/GI-Hd1/CO-Hd3a/FT* と同様に植物間で保存されている花成制御経路であると考えられる。しかし、*ELF6* が *FT* の発現を制御することで日長によらずに花成を制御しているのに対し、*Se14* は *RFT1* の発現を制御することで日長依存的に花成を制御している。また、*ELF6* は *Se14* のように赤色光応答性を示すという知見は報告されていない。*Se14* と *ELF6* のこうした機能性の違いはイネのシロイヌナズナの光周性の違いと結びついており、*Se14* が赤色光応答性を持つことがイネの短日植物化に寄与していると考えられる。このことから、*Se14* と *ELF6* の機能分化の過程と意義を明らかにすることで、イネが感光性を獲得するに至った進化の謎の解明につながることを期待できる。

本研究において、HS112 は稈長、葉身長および分げつ数が野生型よりも有意に増加していた。HS112 はブラシノステロイドへの応答性が野生型よりも強くなっていたことから、*Se14* に開花期制御以外にブラシノステロイド感受性に関与していると考えられる。*Se14* はタンパクの配列構造や機能性から JmjC ドメインを持つタンパクで構成される JARID ファミリーに属し、ヒストン修飾を介して標的遺伝子のクロマチン構造に影響を及ぼすと考えられる。このファミリーに属するイネ遺伝子 *JMJ703* を欠損した変異体は節間伸長や生長増進といった植物ホルモン過剰発現ないしは高感受性様な表現型を示し、このファミリーに属する遺伝子の形態形成における多面的な機能を裏付けた (Cui *et al.* 2013)。このように、ヒストン脱メチル化酵素はクロマチン内に分散するヒストンを非特異的に認識して遺伝子発現パターンを大規模に改変しうることから、多様な効果を持つ可能性が極めて高い。*Se14* のシロイヌナズナのコモログである

ELF6 はシロイヌナズナの花成経路ではフロリゲン *FT* のヒストン脱メチル化によって花成を抑制する一方で、ブラシノステロイドのシグナル伝達因子と相互作用してシグナルを下流に伝える役割を果たすなど多面的な効果が認められている (Yu *et al.* 2008)。本研究においても、*Se14* は開花期制御とブラシノステロイド感受性という異なる制御機構に関与していると結論した。*Se14* 座の突然変異型対立遺伝子 *se14* は開花期と農業構成要素という主要な農業形質に対し広く影響を与えることから、遺伝資源としてイネ育種への活用が期待できる。*Se14* 座の育種利用を推進していくために、今後栽培品種に *se14* を導入して銀坊主とは異なる遺伝子背景下での機能を検証していくことが重要である。



## 第 6 章

### 摘要

短日植物であるイネは、植物間で高度に保存された経路とイネに特異的な経路によって長日条件依存的な花成抑制（感光性）を制御している。感光性遺伝子 *Hdl*、*Ghd7* がそれぞれの経路において主導的な役割を果たしているが、近年これらの遺伝子が収量構成要素に及ぼす効果の詳細が相次いで明らかとなった。本研究は、既知の経路とは異なる感光性経路の探索から新規感光性遺伝子 *Se14* を見出すとともに、*Se14* タンパク質がエピジェネティックな制御を介して既知の感光性制御機構とは異なる経路で開花制御していることを明らかにした。また、*Se14* が収量構成要素へ及ぼす効果から、イネ育種への利用の可能性を検証した。

### 光応答性に基づく開花期突然変異系統の分類（クラスター分析）

既知感光性遺伝子 *Hdl* および *Ghd7* 欠損変異体を含む 81 系統の突然変異系統を供試した。2011 年度は 6 月 9 日に播種を行い、短日条件（2011SD）・長日条件（2011LD）・青色光照射条件（2011BL）・赤色光照射条件（2011RL）の 4 条件で、2012 年度は 5 月 21 日に播種を行い、短日条件（2012SD）・長日条件（2012LD）・青色光照射条件（2012BL）・赤色光照射条件（2012RL）の 4 条件で栽培した。

各条件下での到穂日数を正規化した値を変数としてクラスター分析を行った結果、81 系統を 9 つのクラスターに分類できた。*Ghd7* や *Hdl* の欠損変異系統は同じクラスターに分類された。*Hdl*、*Ghd7* の欠損変異系統と同様に非感光性系統でありながら別クラスターに分類された

HS112 は、長日条件下では野生型よりも早生化するものの、赤色光条件下では野生型よりもむしろ出穂が遅延するという特徴的な光応答性を示した。このことから、HS112 の開花期突然変異遺伝子は未知の感光性制御に関与していると推定された。

### ***Se14* の単離と分子生物学的解析**

HS112 の原因遺伝子 *se14* の単離と機能の解析を行うため、マッピング集団を利用した連鎖解析によって *se14* は第 3 染色体上約 46kb 内に座乗していることを明らかにした。この領域の塩基配列を原品種と比較したところ、HS112 は Os03g0151300 の第 1 エキソンにある 23bp の欠損によるフレームシフトのためにタンパクのドメイン構造が喪失していた。候補領域内の DNA 多型はこれ以外には認められなかったことから、*se14* は Os03g0151300 座の機能欠損型対立遺伝子であると結論した。RACE によって *Se14* の転写産物の全長配列を決定した結果、*Se14* はシロイヌナズナの花成関連遺伝子である *ELF6* と高い相同性を示した。また、*Se14* と既知開花期関連遺伝子の相互作用を検証した結果、*Se14* は *Ghd7* や *Hdl* とは独立の感光性制御系路上で機能していることが示唆された。*Se14* の花成経路における役割を検証するため遺伝子発現解析を行ったところ、HS112 では野生型に比べ花成促進因子 *Ehd1* および *RFT1* の発現が有意に高まっていた。このことから、*Se14* は *Ehd1* と *RFT1* の発現を抑制することで花成を遅延させていることが明らかとなった。*ELF6* はヒストン脱メチル化を介した花成関連遺伝子の発現制御をしていることから、ChIP アッセイによって *Se14* による遺伝子発現制御がヒストン脱メチル化によるものかどうかを確認した。その結果、HS112 の *RFT1* 遺伝子プロモーター近傍においてヒストン H3K4 が高レベルにトリメチル化されていた。以上より、*Se14* はヒストンの脱メチ

ル化によって *RFTI* の発現を抑制することで、従来の感光性遺伝子とは独立に感光性制御を行っていることが明らかとなった。

#### ***Se14* の農業形質への影響の検証**

HS112 の農業形質を調査して原品種と比較した結果、HS112 で稈長・葉身長および穂長が伸長するとともに穂数・地上部乾物重が増大していた。シロイヌナズナでは *ELF6* はブラシノステロイドのシグナル伝達関連遺伝子の発現制御にも関わることから、HS112 の農業形質の変化は *Se14* の機能喪失によるブラシノステロイドのシグナル伝達阻害と関係している可能性が高い。さらに、HS112 のブラシノステロイド応答性を調査した結果、HS112 ではブラシノステロイドに対して強く応答する傾向が認められた。したがって、*Se14* は花成制御以外にブラシノステロイドのシグナル伝達を介して、イネの収量性に関与していることが示唆された。

## 引用文献

浅見武人、奥本裕、齋藤大樹、Yuan Qingbo、門田有希、寺石政義、築山拓司、谷坂隆俊 (2009) *mPing* SCARマーカーを用いた新規感光性遺伝子座se14およびse15のマッピング. 作物研究 **54**: 85-89.

Bai M. Y., Zhang L. Y., Gampala S. S., Zhu S. W., Song W. Y., Chong K. & Wang Z. Y. (2007) Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 13839-13844.

Chardon F. & Damerval C. (2005) Phylogenomic analysis of the *PEBP* gene family in cereals. *J. Mol. Evol.* **61**: 579-590.

Chen Q., Chen X., Wang Q., Zhang F., Lou Z., Zhang Q., & Zhou D. X. (2013) Structural basis of a histone H3 lysine 4 demethylase required for stem elongation in rice. *PLoS genetics* **9**: e1003239.

Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. & Coupland, G. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**: 1030-1033.

Cui X., Jin P., Cui X., Gu L., Lu Z., Xue Y., Weia L., Qia J., Songa X., Luo M., Anc G. & Cao X. (2013) Control of transposon activity by a histone H3K4 demethylase in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 1953-1958.

Doi K., Izawa T., Fuse T., Yamanouchi U., Kubo T., Shimatani Z., Yano M. & Yoshimura A. (2004) Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hdl*. *Genes Dev.* **18**: 926-936.

**Fujino K., Sekiguchi H., Sato T., Kiuchi H., Nonoue Y., Takeuchi Y., Ando T., Lin S., Y. & Yano, M. (2004)** Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **108**:794-799.

**Hagiwara W. E., Uwatoko N., Sasaki A., Matsubara K., Nagano H., Onishi K. & Sano, Y. (2009)** Diversification in flowering time due to tandem *FT* - like gene duplication, generating novel Mendelian factors in wild and cultivated rice. *Mol. ecology* **18**: 1537-1549.

**Hayama R., Yokoi S., Tamaki S., Yano M. & Shimamoto K. (2003)** Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**: 719-722.

**He J. X., Gendron J. M., Sun Y., Gampala S. S., Gendron N., Sun C. Q. & Wang Z. Y. (2005)** BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* **307**: 1634-1638.

**He Z., Wang Z. Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P. & Chory J. (2000)** Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**: 2360-2363.

**細田徳夫 (1979)** 気象要因による水稻生育の変動性に関する研究 : III. 感温性,感光性および基本栄養生長性と自然日長下における出穂の温度反応の関係. 育雑 **29**: 294-304.

**細田徳夫 (1981)** 気象要因による水稻生育の変動性に関する研究 : IV. 日本の主要水稻品種の感温性、感光性、基本栄養成長性と出穂日数の制御要因の地域的特徴. 育雑 **31**: 239-250.

**Ikekawa N. & Zhao Y. J. (1991)** Application of 24-epibrassinolide in agriculture. *ACS Symp.* **474**: 280e291.

**井上博茂 (2008)** 人為突然変異の利用によるイネの新規出穂期遺伝子の創出とその育種利用に関する研究 博士論文, 京都大学, 日本.

**Ishikawa R., Aoki M., Kurotani K.I., Yokoi S., Shinomura T., Takano M. & Shimamoto K. (2011)** Phytochrome B regulates *Heading date 1 (Hd1)*-mediated expression of rice florigen Hd3a and critical day length in rice. *Mol. Genet. Genomics* **285**: 461-470.

**Ishikawa R., Tamaki S., Yokoi S., Inagaki N., Shinomura T., Takano M. & Shimamoto K. (2005)** Suppression of the floral activator Hd3a is the principal cause of the night break effect in rice. *Plant Cell* **17**: 3326-3336.

**Itoh H. & Izawa T. (2013).** The coincidence of critical day length recognition for florigen gene expression and floral transition under long-day conditions in rice. *Mol. Plant* **6**: 635-649.

**Itoh H., Nonoue Y., Yano M. & Izawa T. (2010)** A pair of floral regulators sets critical day length for Hd3a florigen expression in rice. *Nat. Genet.* **42**: 635-638.

**Izawa T. (2007)** Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in Arabidopsis and rice. *J. Exp. Bot.* **58**: 3091-3097.

**Izawa T., Mihara M., Suzuki Y., Gupta M., Itoh H., Nagano A.J., Motoyama R., Sawada Y., Yano M., Hirai M. Y., Makino A. & Nagamura Y. (2011)** *Os-GIGANTEA* confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *The Plant Cell Online* **23**: 1741-1755.

**Izawa T., Oikawa T., Tokutomi S., Okuno K. & Shimamoto K. (2000)** Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J.* **22**:391-399.

**Jeong J. H., Song H. R., Ko J. H., Jeong Y. M., Kwon Y. E., Seol J. H., Amasino R. M., Noh B. & Noh Y. S. (2009).** Repression of *FLOWERING LOCUS T* chromatin by functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in *Arabidopsis*. *PLoS one* **4**: e8033.

**Khripach V., Zhabinskii V. & De Groot A. (2000)** Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.* **86**: 441e447.

- Klose R. J., Kallin E. M. & Zhang Y.** (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7**: 715-727.
- Kobayashi Y. & Weigel D.** (2007) Move on up, it's time for change — mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* **21**: 2371-2384.
- Komiya R., Ikegami A., Tamaki S., Yokoi S. & Shimamoto K.** (2008) *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. *Development* **135**: 767-774.
- Komiya R., Yokoi S. & Shimamoto K.** (2009) A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice. *Development* **136**: 3443-3450.
- Kouzarides T** (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.
- Lee S., Kim J., Han J. J., Han M. J. & An G.** (2004) Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (*SOC1/AGL20*) ortholog in rice. *Plant J.* **38**: 754–764.
- Li J., Wen J., Lease K. A., Doke J. T., Tax F. E. & Walker J. C.** (2002) *BAK1*, an *Arabidopsis* LRR Receptor-like protein kinase, interacts with *BR11* and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213-222.
- Margueron R., Trojer P. & Reinberg D.** (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 163-176.
- Matsubara K., Yamanouchi U., Nonoue Y., Sugimoto K., Wang Z. X., Minobe Y. & Yano M.** (2011) *Ehd3*, encoding a PHD finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. *Plant J.* **66**: 603–612.

- Matsubara K., Yamanouchi U., Wang Z. X., Minobe Y., Izawa T. & Yano M.** (2008) *Ehd2*, a rice ortholog of the maize *INDETERMINATE1* gene, promotes flowering by up-regulating *Ehd1*. *Plant Physiol.* **148**:1425-1435.
- Monden Y., Naito K., Okumoto Y., Saito H., Oki N., Tsukiyama T., Ideta O., Nakazaki T., Wessler S. W. & Tanisaka T.** (2009) High potential of a transposon mPing as a marker system in japonica x japonica cross in rice. *DNA Res.* **16**: 131-140.
- Mora-García S., Vert G., Yin Y., Caño-Delgado A., Cheong H. & Chory J.** (2004) Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **18**: 448-460.
- Nishida H., Inoue H., Okumoto Y. & Tanisaka T.** (2002) A novel gene conferring an extremely long basic vegetative growth period in rice. *Crop Sci.* **42**: 348-354.
- Nonoue Y., Fujino K., Hirayama Y., Yamanouchi U., Lin S. Y. & Yano M.** (2008) Detection of quantitative trait loci controlling extremely early heading in rice. *Theor. Appl. Genet.* **116**: 715-722.
- Osugi A., Itoh H., Ikeda-Kawakatsu K., Takano M. & Izawa T.** (2011) Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol.* **157**: 1128-1137.
- Saito H., Okumoto Y., Yoshitake Y., Inoue H., Yuan Q., Teraishi M., Tsukiyama T., Nishida H. & Tanisaka T.** (2011) Complete loss of photoperiodic response in the rice mutant line X61 is caused by deficiency of phytochrome chromophore biosynthesis gene. *Theor. Appl. Genet.* **122**: 109-118.
- Sun Q. & Zhou D. X.** (2008) Rice jmjC domain-containing gene *JMJ706* encodes H3K9 demethylase required for floral organ development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:13679-13684.
- Tamaki S., Matsuo S., Wong H. L., Yokoi S. & Shimamoto K.** (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**: 1033-1036.



**Tong H., Jin Y., Liu W., Li F., Fang J., Yin Y., Qian Q., Zhu L. & Chu, C.** (2009) DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice. *Plant J.* **58**: 803-816.

**Tong H., Liu L., Jin Y., Du L., Yin Y., Qian Q., Zhu L. & Chu C.** (2012) DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *The Plant Cell Online* **24**: 2562-2577.

**Tsuji H., Taoka K. I. & Shimamoto K.** (2011) Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **14**: 45-52.

**Tsuji H., Taoka K. I. & Shimamoto K.** (2013). Florigen in rice: complex gene network for florigen transcription, florigen activation complex, and multiple functions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **16**: 228-235.

**Tsukada Y. I., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M. E., Borchers C. H., Tempst P. & Zhang Y.** (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**: 811-816.

**Turck F., Fornara F. & Coupland G.** (2008) Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**: 573-594.

**Xu Q.** (2014) An active rice transposon *mPing* facilitates the discovery of useful flowering time genes in rice. Doctor thesis, Kyoto University, Japan.

**Xu Q., Saito H., Hirose I., Katsura K., Yoshitake Y., Yokoo T., Tsukiyama T., Teraishi M., Tanisaka T. & Okumoto Y.** (2014) The effects of the photoperiod-insensitive alleles, *se13*, *hdl1* and *ghd7*, on yield components in rice. *Molecular Breeding* 1-7.

- Xue W., Xing Y., Weng X., Zhao Y., Tang W., Wang L., Zhou H., Yu S., Xu C., Li X. & Zhang Q.** (2008) Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat. Genet.* **40**: 761-767.
- Yan W. H., Wang P., Chen H. X., Zhou H. J., Li Q. P., Wang C. R., Ding Z. H., Zhang Y. S., Yu S. B., Xing Y. X & Zhang, Q. F.** (2011) A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. *Mol. Plant* **4**: 319-330.
- Yang H., Mo H., Fan D., Cao Y., Cui S. & Ma L.** (2012). Overexpression of a histone H3K4 demethylase, JMJ15, accelerates flowering time in *Arabidopsis*. *Plant cell reports* **31**: 1297-1308.
- Yano M., Ebitani T.** (2002) Development of a series of chromosome segment substitution lines and their utilization in the genetic analysis of quantitative traits in rice. *NIAS Ann. Rep.* 27-28.
- Yano M., Katayose Y., Ashikari M., Yamanouchi U., Monna L., Fused T., Babac T., Yamamoto K., Umehara Y., Nagamura Y. & Sasaki T.** (2000) *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**: 2473-2483.
- Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T. & Chory J.** (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* **120**: 249-259.
- Yin Y., Wang Z. Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T. & Chory J.** (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**: 181-191.
- Yu X., Li L., Li L., Guo M., Chory J. & Yin Y.** (2008) Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 7618-7623.

**Yuan Q., Saito H., Okumoto Y., Inoue H., Nishida H., Tsukiyama T., Teraishi M. & Tanisaka T.** (2009) Identification of a novel gene *ef7* conferring an extremely long basic vegetative growth phase in rice. *Theor. Appl. Genet.* **119**: 675–684.

**Zhang Z. H., Wang K., Guo L., Zhu Y. J., Fan Y.Y., Cheng S. H. & Zhuang J. Y.** (2012) Pleiotropism of the photoperiod-insensitive allele of *Hd1* on heading date, plant height and yield traits in rice. *PLoS ONE* **7**: e52538

**Zhao J., Peng P., Schmitz R. J., Decker A. D., Tax F. E., & Li J.** (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant physiol.* **130**: 1221-1229.



